

Aus dem Bereich der Molekularen Zellbiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. P. Lipp

# **Mechanische und hormonelle Regulation von Kalzium in Erythrozyten**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2016**

vorgelegt von:

Jens Gerhard Danielczok

geb. am 19.07.1990 in Püttlingen

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: PD Dr. L. Kaestner

2. Berichterstatter:

*Meiner Familie,  
insbesondere  
meinen Eltern,  
meiner Ehefrau  
und  
für Leon*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Widmung.....</b>	<b>3</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>10</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>11</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>15</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>17</b>
1.1 Der Erythrozyt.....	17
1.2 Hämatopoese.....	18
1.3 Eryptose.....	19
1.4 Das menschliche Kapillarsystem.....	21
1.5 Kalzium und Erythrozyten.....	21
1.6 Blutviskosität und Membranverformbarkeit der Erythrozyten.....	22
1.7 Ionenkanäle und Erythrozyten.....	23
1.7.1 Mechanosensitive Kalziumkanäle auf Erythrozyten am Beispiel des Piezo-1-Kanals.....	28
1.7.2 Kalziumaktivierte Kationkanäle am Beispiel des Gardos-Kanals.....	31
1.7.3 Rezeptoraktivierte Kalziumkanäle am Beispiel des TRPC 6 Kanals.....	32
1.8 Hereditäre Xerozytose.....	33
<b>2. Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>35</b>
3.1 Material.....	35



3.1.1 Verwendete Chemikalien.....	35
3.1.2 Verwendete Farbstoffe.....	35
3.1.3 Verwendete Inhibitoren und Stimulanzen.....	35
3.1.4 Verwendete Geräte und Materialien.....	36
3.1.5 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.....	37
3.2 Methoden.....	37
3.2.1 Ethikvotum und informierte Einwilligung der Spender.....	37
3.2.2 Mikroskopie mit dem konfokalen Laser-Scan System (VisiTech-VTinfinity).....	37
3.2.3 Imaging von Erythrozyten.....	38
3.2.3.1 Gewinnung und Anfärben der Erythrozyten bei humanen Spender.....	38
3.2.3.2 Einstellungen des Mikroskops zur Kalziumdetektion in Erythrozyten.....	39
3.3. Durchführung der Kalziumsignalmessung bei Änderung der Osmolarität.....	39
3.3.1 Inhibition der mechanosensitiven Kalziumkanäle und Kontrollen.....	41
3.4 Durchführung der Kalziumsignalmessung bei direktem mechanischem Druck.....	41
3.5 Vorbereitung und Aufbau der Kalziumsignalmessung in Erythrozyten mit Kapillarmodellen (Microfluidic Chip Device).....	43
3.5.1 Durchführung der Kalziumsignalmessung in Erythrozyten mit Kapillarmodellen.....	45
3.6. Filtrierbarkeit von Erythrozyten.....	45
3.6.1 Blutentnahme und Aufbereitung zu Serum und Erythrozytensuspension.....	45
3.6.2 Aufbau und Zusammensetzung des Filters.....	46
3.6.3 Zeitlich gesteuerte Filtration von Erythrozyten.....	46
3.6.4 Bestimmung der Filtrierbarkeit der Erythrozyten.....	47
3.6.5 Photometrische Bestimmung des Hämoglobinwertes mittels Hämiglobincyanid- Methode.....	48

3.6.6 Filtration von Erythrozyten mit dem mechanosensitivem Kalziumkanalinhibitor GsMTx-4 sowie dem Gardos-Kanal Inhibitor TRAM-34.....	50
3.7 Kalziumsignalmessung bei humanen Spender und Versuchstieren in Abhängigkeit von Prostaglandin E <sub>2</sub> und Erythropoetin.....	50
3.7.1 Tierversuch im Rahmen einer anzeigepflichtigen Maßnahme.....	50
3.7.2 Gewinnung und Anfärbung von humanen und tierischen Erythrozy.....	50
3.7.3 Durchführung der Kalziumsignalmessung bei Stimulation mit Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) und Erythropoetin (EPO).....	51
3.8 Verwendete Software sowie Tests und Abbildungen zur statistischen Auswertung der Ergebnisse.....	51
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
4.1 Kalziumsignalmessung bei mechanischer Stimulation und die Filtrierbarkeit von Erythrozyten.....	53
4.1.1 Kalziumsignalmessung bei Änderung der Osmolarität.....	53
4.1.2 Kalziumsignale bei Änderung der Osmolarität in Anwesenheit von GsMTx-4.....	56
4.1.3 Kalziumsignale bei direktem mechanischem Druck.....	57
4.1.4 Kalziumsignale im Kapillarmodell.....	63
4.2 Filtrierbarkeit von Erythrozyten.....	68
4.3 Kalziumsignalmessung bei hormoneller Stimulation.....	70
4.3.1 Kalziumsignale in Erythrozyten humaner Spender und von Versuchstieren in Abhängigkeit von Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) und Erythropoetin (EPO).....	70
4.3.2 Kalziumsignale bei humanen Spender in Abhängigkeit von PGE <sub>2</sub> und EPO.....	70
4.3.3 Kalziumsignale bei Wildtyp Mäusen in Abhängigkeit von PGE <sub>2</sub> und EPO.....	74
4.3.4 Kalziumsignale bei TRPC 4/5 (-/-) Knock-out Mäusen in Abhängigkeit von PGE <sub>2</sub> und EPO.....	76

4.3.5 Kalziumsignale bei TRPC Hepta-Knock-Out (-/-) Mäusen in Abhängigkeit von PGE <sub>2</sub> und EPO.....	78
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>81</b>
5.1 Kalziumsignalmessung bei mechanischer Stimulation und die Filtrierbarkeit von Erythrozyten.....	81
5.1.1 Kalziumsignalmessung bei Änderung der Osmolarität.....	81
5.1.2 Kalziumsignale bei direktem mechanischem Druck.....	82
5.1.3 Kalziumsignale im Kapillarmodell.....	84
5.2 Filtrierbarkeit von Erythrozyten.....	86
5.3 Kalziumsignalmessung bei hormoneller Stimulation.....	88
5.3.1 Kalziumsignale bei humanen Spendern in Abhängigkeit von PGE <sub>2</sub> und EPO.....	88
5.3.2 Kalziumsignale bei Wildtyp Mäusen in Abhängigkeit von PGE <sub>2</sub> und EPO.....	88
5.3.3 Kalziumsignale bei TRPC 4/5 (-/-) Knock-out Mäusen in Abhängigkeit von PGE <sub>2</sub> und EPO.....	89
5.3.4 Kalziumsignale bei TRPC Hepta-Knock-Out Mäusen in Abhängigkeit von PGE <sub>2</sub> und EPO.....	90
5.3.5 Zusammenfassung und Interpretation der gesammelten Ergebnisse.....	90
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>92</b>
<b>Danksagungen.....</b>	<b>97</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>98</b>

# Abbildungsverzeichnis

Nr.	Titel	Seitennummer
1.1	Schematische Darstellung der Erythropoese	18
1.2	Quartärstruktur des Hämoglobins und molekularer Aufbau der Häm-Gruppe	19
1.3	Schematische Darstellung der Eryptose	20
1.4	Überblick über verschiedene $\text{Ca}^{2+}$ - sensitive Proteine in Erythrozyten	22
1.5	Die Hauptkomponente des Zytoskeletts des Erythrozyten	23
1.6	Formänderung von Erythrozyten in Abhängigkeit von der Reduktion des Querschnittes der Gefäßfläche und Flussgeschwindigkeit	29
1.7	Dendrogramm-Plot der Familie von mechanosensitiven Ionenkanälen	30
1.8	Zebrafisch Erythrozyten: Wild-Typ vs. Piezo-1 KO	31
3.1	Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktion des verwendeten Mikroskops	38
3.2	Schematischer Aufbau des Perfusionssystems zur Kalziumsignalmessung bei Änderung der Osmolarität	40
3.3	Schematische Darstellung des Pipetten-Mikromanipulators mit eingelegter Glaspipette und Kamerasystem	43
3.4	Aufbau eines Microfluidic Chip Device (MCD)	44
3.5	Durchführung Filtration	47
3.6	Chemischer Umwandlungsprozess von Häm zu Hamincyanid	49
4.1	Osmotische Stimulation von Erythrozyten	54
4.2	Einzelzellmessung der relativen Kalziumionenkonzentration bei osmotischer Stimulation	54
4.3	Unterschied osmotische Stimulation zu Kontrolle	55
4.4	Regulation der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ Konzentration bei Änderungen der Osmolarität unter Einfluss von GsMTx-4	56
4.5	Einzelzellmessung bei direktem mechanischem Reiz	58

4.6	Regulation der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ Konzentration bei mechanischem Reiz unter Einfluss von GsMTx-4	60
4.7	Ausschnitte aus einer Fluoreszenz-basierten Konfokalmikroskop-Aufnahme eines Erythrozyten	61
4.8	Unterschiede in der Kalziumkonzentrationsverteilung bei mechanischem Reiz	62
4.9	Ausschnitte aus einer Fluoreszenz-basierten Konfokalmikroskop-Aufnahme eines Erythrozyten bei Passage durch eine Kapillare des MCD	64
4.10	Grafische Darstellung der relativen Fluoreszenz $F/F_0$ in Abhängigkeit der Zeit (t) in Sekunden	65
4.11	Kalziumionenkonzentration von Erythrozyten im Kapillarmodell	66
4.12	Darstellung der prozentualen Filtrierbarkeit der vier verschiedenen Versuchsgruppen	69
4.13	Beispielhafte Darstellung von Erythrozyten der humanen Kontrollgruppe	70
4.14	Beispielhafte Darstellung von humanen Erythrozyten nach $\text{PGE}_2$ – Stimulation	71
4.15	Prozentuale Verteilung der humanen Spendererythrozyten	73
4.16	Median und Responder der Versuchsgruppen bei humanen Spendererythrozyten	74
4.17	Prozentuale Verteilung der Wild-Typ Maus Erythrozyten	75
4.18	Median und Responder der Versuchsgruppen bei Wild-Typ Maus Erythrozyten	76
4.19	Prozentuale Verteilung der TRP C4/C5 dKO Maus Erythrozyten	77
4.20	Median und Responder der Versuchsgruppen bei TRP C4/C5 dKO Maus Erythrozyten	78
4.21	Prozentuale Verteilung der TRPC Hepta-Knock-Out (-/-) Maus Erythrozyten	79
4.22	Median und Responder der Versuchsgruppen bei TRPC Hepta-Knock-Out (-/-) Maus Erythrozyten	80
5.1	Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade bei mechanischem Reiz	85
5.2	Schematische Darstellung der Signalwege während der Filterung von Erythrozyten mit den Inhibitoren GsMTx-4 und Tram-34	87

# Tabellenverzeichnis

Nr	Titel	Seitennummer
1.1	Übersicht von verschiedenen Ionenkanälen auf der Erythrozytenmembran	24
3.1	Verwendete Chemikalien	35
3.2	Verwendete Farbstoffe	35
3.3	Verwendete Inhibitoren	35
3.4	Verwendete Geräte und Materialien	36
3.5	Grundeinstellungen des Mikroskops bei der Kalziumdetektion	39
3.6	Spektren verwendeter Farbstoffe, Laser und Filter	41
3.7	Einstellungen zur Herstellung der Glaspipetten am DMZ Universal Puller	42
3.8	Durchführung der Kalziummessung verwendeten Versuchsgruppen sowie die Konstellationen der Stimulationen	51
3.9	Namen, Entwickler und Funktionen der verwendeten Programme	52
5.1	Aktuelle Datenlage des Einflusses von PGE2 und EPO auf die Kalziumionenänderung von erythroiden Vorläuferzellen und reifen Erythrozyten	91

# Abkürzungsverzeichnis

-xg	engl.: „n -fold gravity“
°C	Grad Celsius (Einheit)
a	Verdünnungskoeffizient
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AM	Acetoxymethylester
c	Konzentration
ca	Zirka
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
Ca <sub>v</sub> -Kanäle	Spannungsabhängige Kalziumkanäle
Ca-CaM-Komplex	Kalzium-Calmodulin-Komplex
Cl <sup>-</sup>	Chloridionen
cm	Zentimeter (Einheit)
CRO	Calcein Red-Orange
Cs <sup>+</sup>	Zäsiumionen
CO	Kohlenstoffmonoxid
d	Schichtdicke
DE	Deutschland
dest.	destillata
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonsäure
DHSt	Dehydrierte hereditäre Stomatozytose
E	Extinktion der Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylenbis(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure
EM-CCD	engl.: „Electron Multiplying Charge Coupled Device“
EPO	Erythropoetin
et al.	Siehe u.a
F(TH)	Engl.: „Force Prepulld“
FACS	Engl.: „fluorescence-activated-cell-sorting“
Fe <sup>3+</sup>	Eisenionen
G	Gauge (Maßeinheit)
ggf.	gegebenenfalls
H	Engl.: „Heat“
h	Stunde (Einheit)
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure)
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
Int. J. Mol. Sci.	International Journal of molecular Science
IRE	Irland
ISR	Israel
K <sup>+</sup>	Kaliumionen
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Kalium-Hexazyanoferat-III
K <sub>Ca</sub> -Kanal	Kalziumabhngiger Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
KCN	Kaliumcyanid
KO	Knock-Out
l	Liter (Einheit)
La <sup>3+</sup>	Lanthanionen
MCD	engl.: „Microfluidic Chip Device“



mg	Milligramm (Einheit)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten (Einheit)
ml	Milliliter (Einheit)
mM	Millimol (Einheit)
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mosmol	Milliosmolar (Einheit)
ms	Millisekunden
mV	Millivolt (Einheit)
n	Anzahl
Na <sup>+</sup>	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>v</sub> -Kanäle	Spannungsabhängige Natriumkanäle
NH <sup>4+</sup>	Ammonium-Ion
nM	Nanomol (Einheit)
nm	Nanometer (Einheit)
NMDG	N-Methyl-D-glucamin
No.	engl.: „Number“
Nr.	Nummer
ns	Nicht signifikant
p	p-Wert; Signifikanzwert
PBS	engl.: "Phosphate-buffered Solution"
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGE <sub>2</sub>	Prostagandin E <sub>2</sub>
pH	Lat.: „potentia Hydrogenii“; pH-Wert
pS	Pikosiemens (Einheit)

Rb <sup>+</sup>	Rubidiumionen
RBCs	Engl.: „Red blood Cells“
ROI	Engl.: „Region of interest“
SD	Standartabweichung
s(H)	Engl.: „Distance heatstop“
S(TH)	Engl.: „Distance threshold“
SWE	Schweden
Tab	Tabelle
TRPC	Engl.: „Transient Receptor Potential Cononical“
t(H)	Engl.: „Delay heatstop“
u.a.	Unter anderem
UK	Engl.: „United Kingdom“
USA	Engl.: „United States of America“
v	Geschwindigkeit (Einheit)
WT	Wild-Typ
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
ε	Extinktionskoeffizient
μl	Mikroliter (Einheit)
μM	Mikromol (Einheit)
μm	Mikrometer (Einheit)

# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse in Bezug auf das funktionelle Verhalten von Erythrozyten bei mechanischer und hormoneller Stimulation kalziumionenabhängiger Prozesse gezeigt. Kalziumionen sind auf Grund des Gradienten zwischen Zytosol und extrazellulärer Umgebung ein wichtiger Aktivator für intrazellulärer Prozesse. Durch die Aktivierung von mechanosensitiven Kationenkanälen, wie beispielsweise Piezo-1 kann in Sekundenschnelle eine Signalkaskade in Bewegung gesetzt werden, welche die Flexibilität und das Volumen der Zelle der Umgebung anpasst und es somit der Zelle ermöglicht Engstellen, z.B. im kapillaren Blutfluss oder den Milzsinusoiden, zu passieren. Auch durch körpereigene Hormone lässt sich der Kalziumioneneinstrom beeinflussen. Im Fokus dieser Arbeit stand dabei die hormonelle Stimulation verschiedener TRPC-Kanäle durch Prostaglandin E<sub>2</sub> und Erythropoetin. Die Arbeit teilte sich wie folgt in drei Teilprojekte. Das erste Teilprojekt zeigte zunächst, dass es durch osmotischen Druck auf reife Erythrozyten zu einem Kalziumioneneinstrom in die ruhende Zelle kommt. Dieses Signal konnte durch Zugabe eines Inhibitors für mechanosensitive Kationenkanäle unterbunden werden. Auch ein direkter mechanischer Druck auf die Zellmembran mittels Glaspipette führte zu einem Einstrom von Kalziumionen in den Erythrozyten, welcher ebenfalls durch die Inhibition mechanosensitiver Kationenkanäle unterdrückt werden konnte. Zum Abschluss dieses ersten Teilprojektes konnte zum ersten Mal mit Hilfe von künstlichen Kapillarsystemen das funktionelle Verhalten von Erythrozyten bei der Passage von Engstellen im Zusammenhang mit dem Einfluss von Kalziumionen gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Versuche dienen als Grundlage für weitere Experimente, wie beispielsweise Mausmodelle bei denen mittels Rückenhautkammer der einzelne Erythrozyt in vivo bei der Passage kapillarer Engstellen, in Bezug auf die Änderung der intrazellulären relativen Kalziumionenkonzentration, gemessen werden kann. Hierdurch erhoffe ich mir in Zukunft neue Erkenntnisse im Bezug auf seltene Anämien, wie der hereditären Xerozytosis, welche mit einer Mutation des Piezo-1 Gens assoziiert ist. Im zweiten Teilprojekt konnte gezeigt werden, dass sowohl mechanosensitive Kationenkanäle, als auch Gardoskanäle die Filtrierbarkeit von Erythrozyten beeinflussen. Eine Inhibition der beiden Kanäle zeigte dabei eine schlechtere Filtrierbarkeit der Erythrozyten durch einen Zellulosefilter, als die native Kontrollprobe. Dieses experimentelle Verfahren könnte dabei, durch weitere Optimierung in Folgeexperimenten, der schnellen und kostengünstigen Ermittlung der Filtrierbarkeit von Erythrozyten dienen. Auch Krankheiten, welche die Filtrierbarkeit von Erythrozyten beeinflussen, könnten mit diesen einfachen Verfahren schnell und effizient diagnostiziert werden. Das letzte Teilprojekt zeigte die hormonelle Stimulation von TRPC-Kanälen auf Erythrozyten mittels Prostaglandin E<sub>2</sub> und Erythropoetin. Dabei dienten gesunde Spendererythrozyten, Wildtyp- Mauserythrozyten, sowie drei Gruppen von verschiedenen TRPC Knock-Out Mauserythrozyten als Versuchsproben. Durch Messung der hormonell stimulierten Kalziumsignaländerung der jeweiligen Gruppen, konnten bereits bekannte Effekte der TRPC Kanäle beim Menschen bestätigt werden. TRPC Kanäle sind hauptverantwortlich für den Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulierten Kalziumioneneinstrom beim Menschen. Dieser Einstrom konnte durch Erythropoetin inhibiert werden. Des Weiteren zeigte sich besonders durch Vergleich der Erythrozyten von Wildtyp-Mäusen und TRP C4/C5 Knock-Out Mäusen mit humanen Spendererythrozyten, dass zumindest funktionell bei reifen menschlichen Erythrozyten keine aktiven TRP C4/C5 Kanäle in der Membran vorhanden sind. Sowohl die hormonelle Stimulation der TRP C4/C5 Kanäle mit Prostaglandin E<sub>2</sub>, als auch mit Erythropoetin führte in meinen Experimenten zu einem Kalziumioneneinstrom in den murinen Erythrozyten. Diese Erkenntnisse nähren Zweifel, dass Wildtyp-Mäuse ein geeignetes Modell zur hormonell stimulierten Kalziumsignalmessung im Bezug auf TRPC-Kanäle beim Menschen darstellen.

# Abstract

This scientific work shows current findings in relation to the functional behaviour of red blood cells by mechanical and hormonal stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent processes. Due to its gradient across the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  is an important activator of intracellular processes. A stimulation of mechanosensitive cation channels, such as Piezo-1, leads to a rapid  $\text{Ca}^{2+}$  influx, which activates a signaling cascade which quickly changes volume and flexibility of the red blood cells. This enables them to pass constrictions like the capillary system or splenic sinusoids. Also endogenous hormones have an effect on  $\text{Ca}^{2+}$  influx. This work focuses on hormonal stimulation of TRPC-channels in presence of Prostaglandine  $\text{E}_2$  and Erythropoetin. The whole dissertation is divided in three parts. At the beginning of the first part  $\text{Ca}^{2+}$  influx is provoked by osmotic pressure on the membrane of resting red blood cells. This influx can be suppressed by adding an inhibitor of mechanosensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -channels. Also direct mechanical pressure on the RBCs membrane by a glass pipette leads to a  $\text{Ca}^{2+}$  influx, which also can be blocked after incubating red blood cells with this inhibitor. For the first time the functional behaviour of erythrocytes in correlation with the influence of  $\text{Ca}^{2+}$  can be shown by red blood cells passing constrictions in an artificial capillary system. The findings of this part can be the basics for future experiments, in particular mouse models with dorsal-skin preparation, which shows single red blood cells passing constrictions in vivo. As a result I expect new knowledge in relation to rare anaemias like hereditary Xerocytosis which is associated with mutations in the Piezo-1 gene.

The second part of the project shows an influence of mechanosensitive channels and Gardos-channels on filtration of red blood cells. An inhibition of these channels shows a decrease in filterability in comparison to a control group. After some optimisation in future experiments this experimental method could be used as a quick and efficient instrument for filterability issues on red blood cell suspensions. Also diseases, which affect the filterability of red blood cells could be diagnosed quickly and low-priced. The last part refers to the hormonal stimulation of TRPC-channels due to Prostaglandin  $\text{E}_2$  and Erythropoetin. Human red blood cells, wildtype-mouse RBCs and RBCs of three different groups of TRPC knock-out mice were tested and compared. Measurements of changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in these groups confirm already known effects of hormonal stimulation of TRPC channels in human red blood cells. TRPC channels are responsible for an Prostaglandin  $\text{E}_2$ -dependent influx of  $\text{Ca}^{2+}$  in human red blood cells. This influx can be inhibited by Erythropoetin. Furthermore comparing wildtype-mouse RBCs with TRP C4/C5 mouse erythrocytes and human red blood cells shows, that there is no functional active TRP C4/C5 channel on surface of adult human RBCs. Both hormonal stimulation with Prostaglandin  $\text{E}_2$  and Erythropoetin activating TRP C4/C5 leads to an increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in murine erythrocytes. These results suggest that wildtype-mice red blood cells aren't an adequate model for hormonal stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  measurements caused by TRPC-channels to compare with human red blood cells.

# 1. Einleitung

*„Blut ist ein ganz besonderer Saft.“*

*Johann Wolfgang von Goethe*

*(1749 - 1832), deutscher Dichter der Klassik, Naturwissenschaftler und Staatsmann. aus Faust, der Tragödie erster Teil, 1808*

Der menschliche Körper besteht aus einer Vielzahl differenzierter Zellen, deren Zusammenspiel entscheidend für die Funktionalität des Organismus ist. Bestimmte Zellarten lagern sich zu funktionellen Kompartimenten zusammen, was man als Organ bezeichnet. Unterschieden wird hier zwischen soliden, einfach angelegten Organen, wie dem Herzen, der Leber, der Milz oder dem Gehirn, paarigen Organen wie den Nieren und der Lunge, aber auch Systemen wie der Haut, dem Bewegungsapparat mit Muskeln und Knochen oder dem kardiovaskulären System. Die Hauptaufgabe des Kreislaufsystems ist die Versorgung des Körpers mit Blut. Blut wiederum ist ein heterogenes Gemisch aus Zellen, löslichen Bestandteilen sowie Flüssigkeit, das als Suspension vorliegt und unterschiedliche Aufgaben, wie die Versorgung der Peripherie mit Sauerstoff und Nährstoffen, den Abtransport von Schadstoffen und Abbauprodukten, die Immunabwehr, die Gerinnung sowie die Aufrechterhaltung des Säure-Base-Haushaltes, erfüllt. Einen entscheidenden Beitrag zur Homöostase aller Organe leistet der Erythrozyt.

## 1.1 Der Erythrozyt

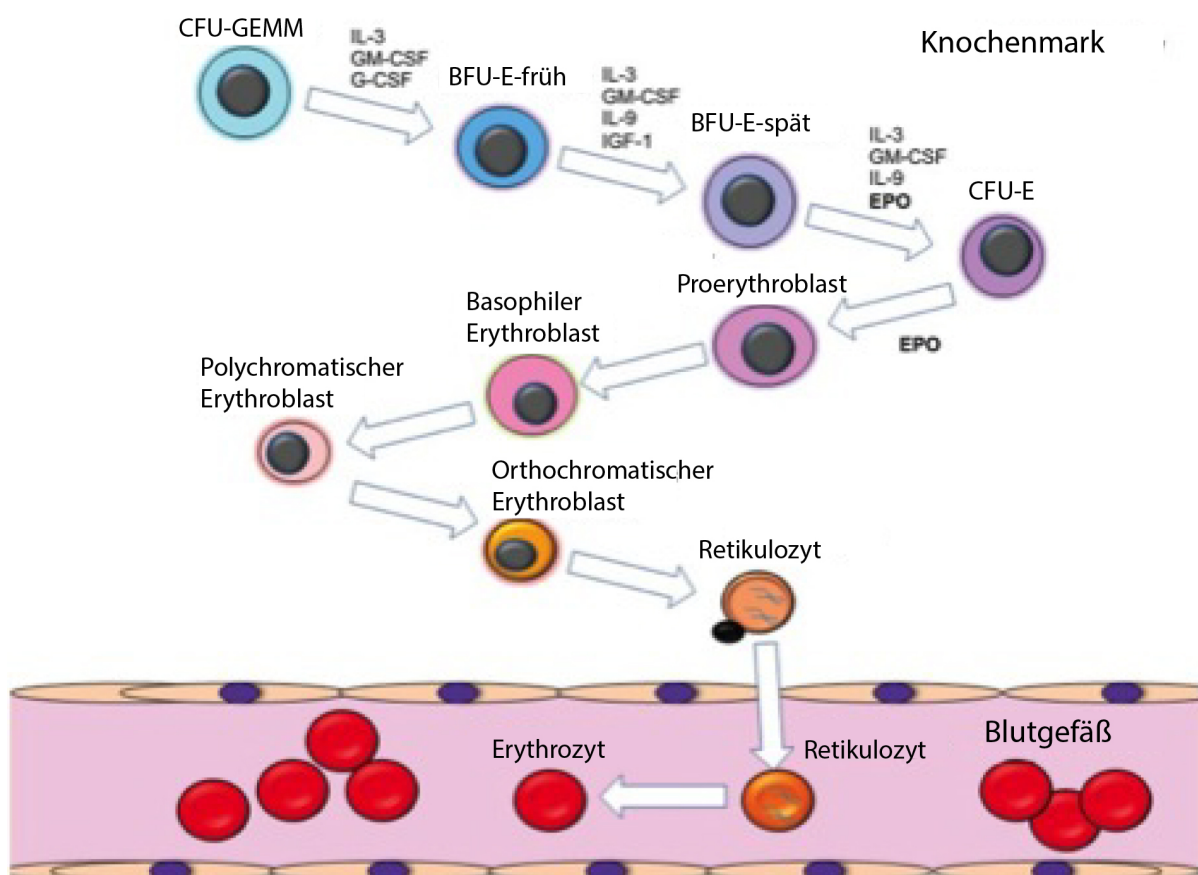
Erythrozyten bilden den Hauptbestandteil der menschlichen Blutzellen und stellen sich im Blutausschlag als flache Scheiben mit einem Durchmesser von ca. 7 µm und einer Dicke von ca. 2 µm dar (Gekle M. et al. 2010). Das Blutvolumen des Erwachsenen korreliert mit der (fettfreien) Körpermasse und beträgt bei Frauen 4 - 4,5 l und bei Männern 4,5 – 5 l. Ein gesunder Erwachsener besitzt im Durchschnitt ca.  $5 \times 10^6$  rote Blutzellen pro µl Blut (Silbernagl S. und Despopoulos A., 2006).

Die Hauptaufgabe der roten Blutkörperchen ist der Transport von Sauerstoff über das Protein Hämoglobin, was ca. 1/3 der Zellmasse ausmacht. Außerdem sind die Erythrozyten am Transport von Kohlendioxid und der Pufferung zur Aufrechterhaltung der physiologischen Protonenkonzentration im Extrazellulärraum involviert (Löffler G. und Petrides P., 2014).

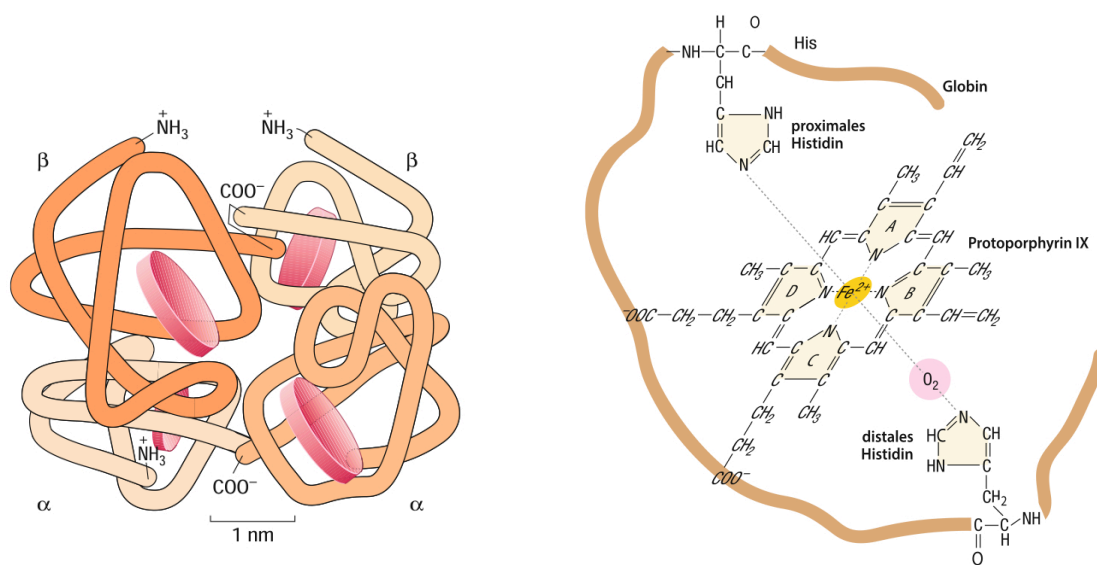
## 1.2 Hämatopoese

Die Blutbildung findet während der Embryonal- und Fetalzeit zunächst im Dottersack, später in Leber und Milz statt. Nach der Geburt wird die Hämatopoese gänzlich vom Knochenmark übernommen (Schiebler, T.H. 2007). Alle im Blut befindlichen Zellen werden aus pluripotenten Stammzellen gebildet und differenzieren je nach Stimulation zu Immunzellen, Megakaryozyten, aus welchen sich die Blutplättchen abschnüren, oder Erythrozyten aus. Die Erythropoese beschreibt die Differenzierung von Stammzelle zu Erythrozyt und ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Die Dauer der Reifung von der Stammzelle bis zum Erythrozyten beträgt 8 Tage. Dabei durchlaufen die Zellreihen mehrere Teilungen, so dass aus einer Stammzelle immer mehrere Erythrozyten hervorgehen (Ulfig N. et al. 2011).

Die Steuerung der Erythropoese ist ganz wesentlich von Erythropoetin abhängig, welches beim Erwachsenen überwiegend in der Niere gebildet wird. Der reife Erythrozyt besitzt weder Zellkern noch Zellorganellen, der Stoffwechsel ist anaerob (Gekle M. et al. 2010). Das während der Erythropoese in den Erythrozytenvorstufen gebildete Hämoglobin besteht aus je zwei alpha- und beta- Globinketten mit je einer Häm-Gruppe. Im Zentrum der Häm-Gruppe steht ein zweifach positiv geladenes Eisenion, welches über eine freie Valenz Sauerstoff reversibel binden kann und somit die Hauptfunktion des Hämoglobins, nämlich den Sauerstofftransport, ermöglicht. (Löffler G. und Petrides P. 2014) Abbildung 1.2 zeigt die Struktur von Hämoglobin und den Aufbau einer Häm-Gruppe.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der Erythropoese: Aus pluripotenten Stammzellen des Rückenmarks (CFU-GEMM, colony forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte) werden durch Stimulation mit Interleukin 3 (IL-3), Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF, granulocyte monocyte colony stimulating factor) und Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor (G-CSF, granulocyte colony stimulating factor) frühe Blasten-bildende-Zelleinheiten (BFU-E-früh, blast forming unit-erythroid). Durch weitere Stimulation mit IL-3 und GM-CSF sowie Interleukin-9 (IL-9) und Insulin-like-growth-Faktor-1 (IGF-1) reifen die erythroiden Zellen weiter (BFU-E-spät) bis sie Erythropoetin-abhängig (EPO) zu Kolonie-bildenden-Zelleinheiten (CFU-E, colony-forming-unit-erythroid) ausdifferenzieren. Unter weiterer EPO-Stimulation reifen die Zellen zu Proerythroblasten, welche durch Reifung und Teilung zu basophilen Erythroblasten werden. Durch Verkleinerung des Zellkerns und Abnahme der Basophilie entstehen die noch teilungsfähigen polychromatischen Erythroblasten, welche durch verstärkte Hämoglobinsynthese und den Verlust der Teilungsfähigkeit zu orthochromatischen Erythroblasten werden. Der Kern kondensiert weiter, wird ausgestoßen und phagozytiert. Dadurch entsteht ein Retikulozyt, welcher noch reich an Ribosomen ist und das Knochenmark in die Blutgefäße verlässt, um dort zum Erythrozyten zu reifen. (Quelle: Angus M Sinclair, Biologics. 2013).

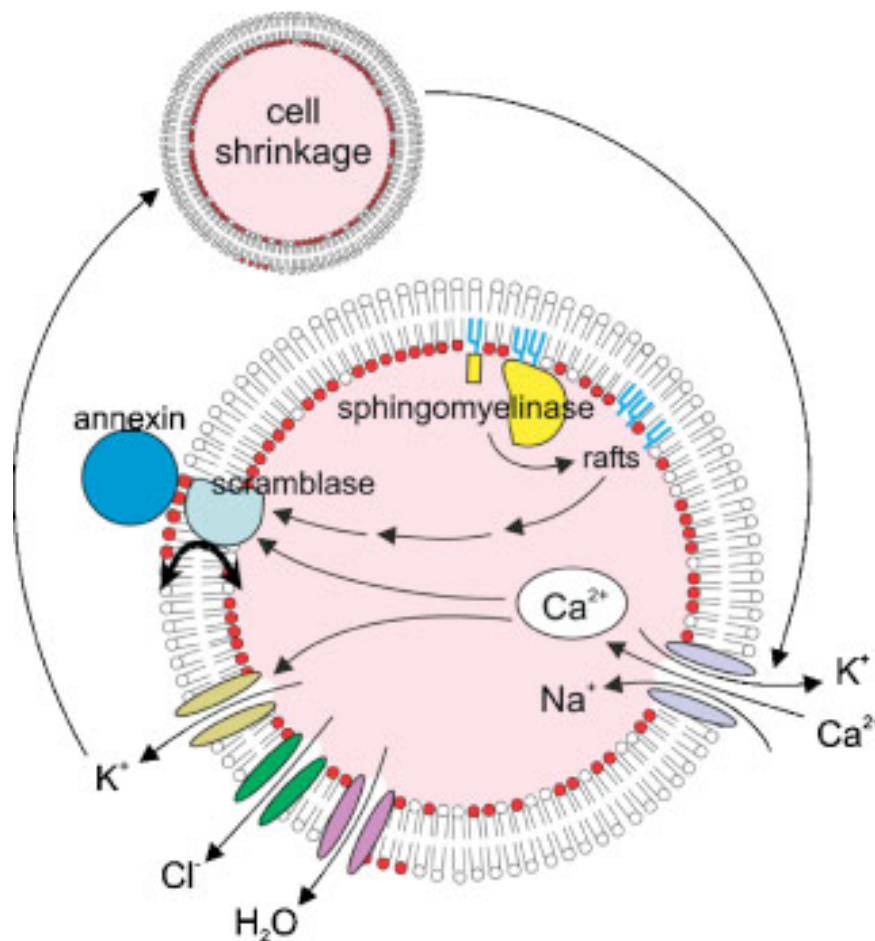


**Abbildung 1.2:** A zeigt die Quartärstruktur des Hämoglobins: Es sind jeweils zwei identische alpha- und beta-Ketten dargestellt (orange/gelbliche Bänder), mit jeweils einer Häm-Gruppe in der Mitte (rote Plättchen). B zeigt die Häm-Gruppe im molekularen Aufbau. Die Globinkette ist als hellbraunes Band angedeutet. Das zentrale Eisenion ( $\text{Fe}^{2+}$ , gelber Kreis) besitzt 6 Valenzen. 4 Valenzen sind an jeweils ein Stickstoffatom des Protoporphyrin IX gebunden. Die 5. Valenz bindet an ein Stickstoffatom des proximalen Histidins. Die verbliebene Valenz bindet reversibel Sauerstoff ( $\text{O}_2$ , roter Kreis). Diese reversible Verbindung bezeichnet man als Oxygenierung. (Quelle: Löffler G. und Petrides P. 2014)

### 1.3 Eryptose

Die Überlebensdauer des roten Blutkörperchens beträgt beim Gesunden ca. 120 Tage, der Abbau findet überwiegend in der Milz statt (Silbernagl S. und Despopoulos A., 2006). Florian Lang et al. verwendeten den Begriff Eryptose erstmals 2003 und beschrieben das Äquivalent zur Apoptose von kernhaltigen Zellen, also den Mechanismus des programmierten Zelltodes, von Erythrozyten. Sie konnten zeigen, dass bestimmte Reize, wie osmotischer

Schock, oxidativer Stress, Energiemangel, sowie verschiedene Medikamente und Substanzen, die Aktivierung eines Signalweges auslösen, an dessen Ende ein äquivalentes Produkt zur Apoptose kernhaltiger Zellen steht, nämlich der Funktionsverlust, die Schrumpfung und der Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie (Lang, F. et al. 2004).  $\text{Ca}^{2+}$  spielt bei der Einleitung dieses Mechanismus eine entscheidende Rolle. Durch  $\text{Ca}^{2+}$  werden verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Proteine in der Zelle aktiviert, welche die Eryptose stimulieren. Abbildung 1.3 zeigt schematisch den Mechanismus der Eryptose bei osmotischem Schock.



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Eryptose. Durch Reize, wie z.B. den osmotischen Schock, kommt es zu einem vermehrten Kalziumioneneinstrom in den Erythrozyten.  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert unter anderem den  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Gardos Kanal und das Protein Scramblase. Der Gardoskanal ist ein Kaliumkanal, welcher bei Aktivierung Kalium aus der Zelle lässt, wodurch passiv  $\text{H}_2\text{O}$  und Chloridionen folgen und die Zelle an Volumen verliert und schrumpft. Die Aktivierung der Scramblase führt zur Aufhebung der Phosphatidylserinasymmetrie wodurch vermehrt Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran gelangt, was durch die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Annexin sichtbar gemacht werden kann (Lang F. et al. , 2004). Die Zellschrumpfung aktiviert die Sphingomyelinase, welche Ceramide aus der inneren Membran aktiviert, welche die Kalziumsensitivität der entsprechenden  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Proteine verstärken. (Quelle: Lang, F. et al. Cell volume and the regulation of apoptotic cell death, Journal of Molecular Recognition, 2004).

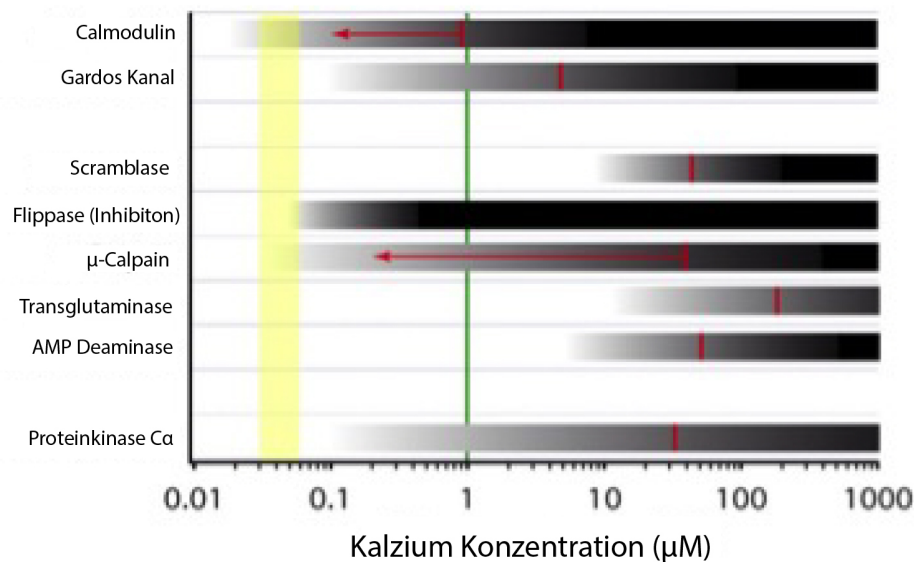


## 1.4 Das menschliche Kapillarsystem

Das menschliche Kapillarsystem ist ein komplex aufgebautes, sich verzweigendes Blutgefäßsystem, welches dem arteriellen und dem venösen Kreislauf zwischengeschaltet ist. Aufgrund seines besonderen histologischen Aufbaus, sowie der niedrigen Flussgeschwindigkeit des Blutes ist es ideal für den Stoffaustausch zwischen Blut und peripherem Gewebe geeignet. Kleinste Blutkapillaren haben einen Durchmesser von 4-8  $\mu\text{m}$ , die Zwischenräume des diskontinuierlichen Kapillartyps in der Milz sogar nur 0.1 – 1  $\mu\text{m}$  (Huppelsberg, J. und Walter, K. 2013). Ein vitaler Erythrozyt muss somit Engstellen passieren, die um ein Vielfaches kleiner sind, als sein eigentlicher Durchmesser von rund 7.5  $\mu\text{m}$ . Kalzium spielt bei dieser Eigenschaft des Erythrozyten eine entscheidende Rolle. Durch den weiter unten genauer beschriebenen Gradienten und das damit verbundene Potential kann binnen weniger Millisekunden eine Signalkaskade aktiviert werden, die gleichzeitig das Zellvolumen vermindert und das Zytoskelett der Zelle derart anpasst, dass eine Passage durch die feinen Kapillaren der Lunge oder das Milznetz möglich ist. Eine adäquate Kalziumsignalantwort auf äußere Reize ist somit Voraussetzung für die Passage der Erythrozyten durch diese Kompartimente des menschlichen Kapillarsystems.

## 1.5 Kalzium und Erythrozyten

Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) spielen in roten Blutkörperchen eine entscheidende Rolle für Metabolismus, strukturelle Integrität, Volumen und nicht zuletzt Verformbarkeit. Diese Eigenschaft als Signalmolekül hat  $\text{Ca}^{2+}$  vor allem seiner Konzentrationsverteilung zu verdanken. In den roten Blutzellen beträgt die Konzentration an Kalziumionen in gebundener und ungebundener Form ca. 5,7  $\mu\text{M}$ . Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration liegt zwischen 30 und 60 nM (Bogdanova A. et al. 2013). Stellt man diesen Wert der physiologischen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration von 1,8 mM gegenüber kommt man auf einen Plasma/Zytosol Gradienten von 40.000-fach. Zur Aufrechterhaltung dieses Gradienten trägt zum einen die geringe Permeabilität der Membran für Kalziumionen ( $\sim 50 \mu\text{mol}/(\text{l}_{\text{cells}} \text{ h})$ ) und zum anderen die sehr effektive Plasma-Membran- $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe (PMCA) bei. Durch dieses extreme Gefälle eignet sich  $\text{Ca}^{2+}$  optimal als schnelles Signalmolekül. Erythrozyten sind über diverse Ionenkanäle in der Lage, die innere freie Konzentration an Kalziumionen innerhalb einiger Millisekunden auf ein 10-faches zu steigern und somit  $\text{Ca}^{2+}$ -sensible Proteine zu aktivieren, welche wiederum die oben genannten Veränderungen in der Zellhomöostase bewerkstelligen (Bogdanova A. et al. 2013). Beispielhaft für die kalziumabhängige Motalität sei Calmodulin zu nennen. Calmodulin ist ein intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, welches bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 940 nM dissoziiert und regulatorisch als Ca-CaM-Komplex in die Verformbarkeit des Zytoskelett eingreift (Bogdanova A. et al. 2013). Abbildung 1.4 zeigt eine Grafik mit verschiedenen Proteinen und ihren Aktivierungskonzentrationen.



**Abbildung 1.4:** Überblick über verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Proteine in Erythrozyten. Der gelbe Balken zeigt die ungefähre freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in nicht-stimulierten, intakten Erythrozyten. Die dunkeln Balken zeigen zu jedem Protein den Aktivierungslevel der jeweiligen Proteine im Bezug auf die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration wobei die Intensität der Graustufe mit dem Aktivierungslevel korreliert. Die roten Linien zeigen die Kalziumionenkonzentration an, bei der die Hälfte der jeweiligen Proteine aktiviert ist. Zur Orientierung zeigt die grüne Linie die Dissoziationskonstante für Fluo-4 in Zellen. Die Dissoziationskonstante verschiedener Proteine, so auch Calmodulin oder  $\mu$ -Calpain kann durch verschiedene Mechanismen bzw. Interaktionen herunterreguliert werden, was durch die roten Pfeile dargestellt wird. Proteine, wie die Scramblase, welche die Eryptose stimulieren werden erst bei höheren Kalziumionenkonzentrationen aktiviert. (überarbeitet und übersetzt aus Quelle: Bogdanova A. et al. Calcium in Red Blood Cells – A Perilous Balance Int. J. Mol. Sci. 2013)

## 1.6 Blutviskosität und Membranverformbarkeit der Erythrozyten

Die Viskosität des Blutes liegt durch den hohen Erythrozytenanteil über der Plasmaviskosität, was dazu führt, dass die Fließeigenschaften der roten Blutzellen einen großen Anteil an der Viskosität des Blutes haben (Baumann R. et al. 2010). Nach dem Fahraeus-Lindqvist-Effekt, ist die Zähflüssigkeit des Blutes in großen Gefäßen, wegen der turbulenten Strömung, und in Kapillaren, wegen der Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit, am größten (Silbernagl S. und Despopoulos A. 2006). Die dennoch guten Fließeigenschaften der Erythrozyten sind auf die gute Verformbarkeit ihrer Membran zurückzuführen und erlauben den Zellen ohne Schwierigkeiten durch Kapillaren zu passen, die deutlich kleiner als sie selbst sind. Der transmembranale Anionentransporter AE1 (Bande-3-Protein) dient hier als Anker für die Assemblierung der an der Membrannenseite liegenden Proteine Ankyrin und Spektrin, das als Tetramer vorliegt. Die Spektrintetramere wiederum werden über Bande-4.1-Protein und Aktin miteinander verknüpft. Durch weitere Verbindungen von Glykophorin mit Bande-3- und Bande-4.1-Proteinen wird die Form des Erythrozyten stabilisiert (Baumann R. et al. 2010). Ein Protein das dabei die Spektrin-Aktin-Bindung in Anhängigkeit des Bande-4.1-Protein stimuliert ist Adducin (Mische S.M. et al. 1987). Adducin besteht aus zwei Untereinheiten, wobei eine den zuvor beschriebenen Ca-CaM-Komplex bindet, was zu einer verminderten der Spektrin-Aktin-Bindung führt und somit die Verformbarkeit der Membran erhöht (Mische S.M. et al. 1987). Abbildung 1.5 zeigt die Organisation der Hauptkomponenten des Zytoskeletts von Erythrozyten.

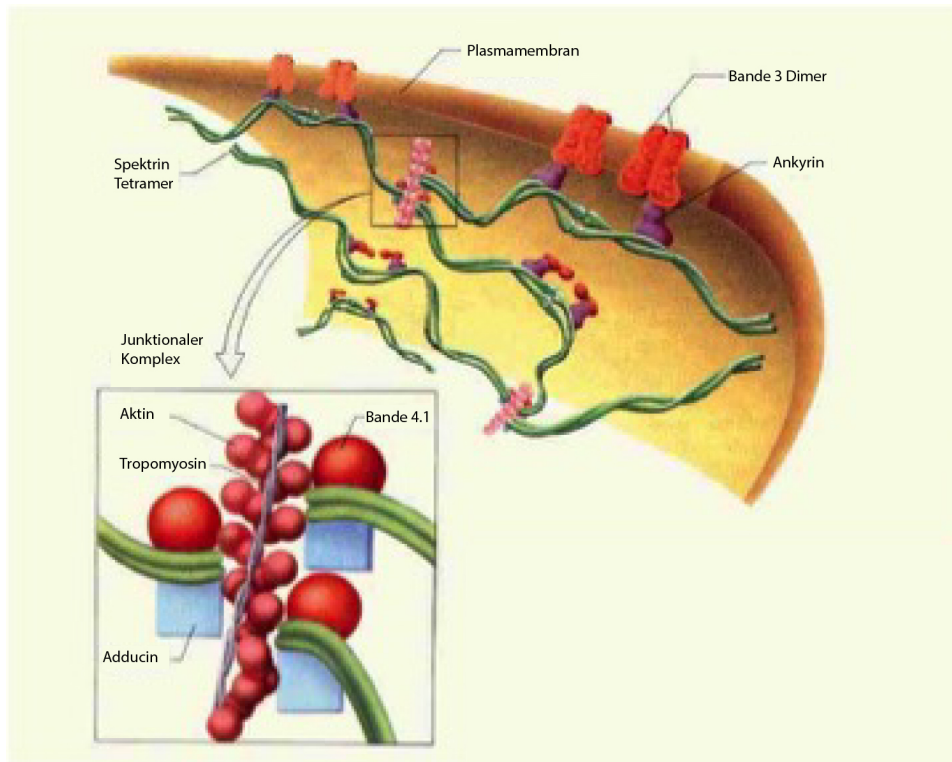


Abbildung 1.5: Die Hauptkomponente des Zytoskeletts der Erythrozyten besteht aus dem transmembranös verankerten Bande 3.1 Dimer. Dieses bindet über Ankyrin die Spektrintetramere, welche über Aktin quervernetzt sind und damit die Membran stabilisieren. Diese Quervernetzung ist von Bande 4.1 abhängig und wird durch Adducin stimuliert (hier nochmals vergrößert dargestellt. Siehe Pfeil). Durch die Bindung des Ca-CaM-Komplexes sinkt die Bindung von Aktin an Spektrin (frei überarbeitet und übersetzt aus Quelle: Lux, S.E. 1979).

Durch Erhöhung der Konzentration von Calmodulin, hier ist der durch Kalzium aktivierte Kalzium-Calmodulin-Komplex (Ca-CaM) gemeint, nimmt die Bindung von Adducin an Aktin ab, was zu einer Verminderung der Spektrin-Aktin-Bindung führt und somit die Verformbarkeit der Membran erhöht. Eine Erhöhung der Calmodulinkonzentration ohne freies Kalzium führte zu keiner Verminderung der Adducinbindung. (Mische S.M. et al. 1987).

## 1.7 Ionenkanäle und Erythrozyten

Ionenkanäle sind Transmembranproteine, welche auf einen bestimmten Stimulus ihre Konformation ändern und somit kleine Poren bilden, die auf Grund ihrer elektrischen und strukturellen Eigenschaften bestimmte Ionen, in Richtung ihres elektrochemischen Potentials, passieren lassen. Der Stimulus zur Aktivierung kann dabei je nach Eigenschaft des Kanals chemisch durch meist allosterische Bindung einer entsprechenden Substanz, elektrisch durch die Fortleitung eines Transmembranpotentials oder auch durch einen direkten mechanischen Reiz erfolgen. Bekannte Vertreter der elektrisch aktivierten Transmembranproteingruppe sind spannungsabhängige Natriumkanäle ( $\text{Na}_v$ ), wie sie im Myokard oder im zentralen Nervensystem (ZNS) vorkommen und für die schnelle Erregungsweiterleitung essentiell sind (Schmidt R. und Lang F. 2007). Prominente chemisch aktivierte Ionenkanäle finden sich ebenfalls im ZNS und sind hier unter anderem in die Übertragung präsynaptischer Signale an

die Postsynapse involviert. Beispielhaft zu nennen sei hier der AMPA-Rezeptor, ein postsynaptischer Kationenkanal, der nach allosterischer Bindung von präsynaptisch abgegebenem Glutamat aktiviert wird (Schmidt R. und Lang F. 2007). Die hier genannten Beispiele sollen jedoch nicht über die Vielzahl und Ubiquität von Ionenkanälen hinwegtäuschen. Nahezu alle Zellen des menschlichen Körpers weisen Ionenkanäle in unterschiedlichen Formen und Konzentrationen in ihrer Membran auf, da diese es den Zellen erlauben mit ihrer Umwelt zu kommunizieren und schnell auf Reize zu reagieren. Mechanisch aktivierte Ionenkanäle nehmen eine besondere Stellung ein, da sie überall dort auftauchen, wo Druck oder Zugkräfte direkt auf die Zellmembran wirken (Xiao R. und Shawn Xu X.Z. 2010). Gerade in der Embryonalentwicklung ist das Vorhandensein dieser Kanäle für das Wachstum und die Anlage verschiedenster Systeme von elementarer Bedeutung. Mutationen die mit Unterexpression oder Funktionsverlust einhergehen, können daher bereits pränatal zu Komplikationen bei der Entwicklung des Ungeborenen führen (Andolfo I. et al., 2013).

Die Erythrozytenmembran weißt eine Vielzahl verschiedenster Ionenkanäle auf und dient daher der Forschung bereits seit mehreren Jahrzehnten als Modell für zellbiologische und elektrophysiologische Experimente (Bouyer G. et al., 2012). Entscheidende Vorteile der Erythrozyten als Membranmodell sind die ubiquitäre Verfügbarkeit in allen Säugetieren, der hohe Differenzierungsgrad, die einfache Gewinnung auch beim Menschen, sowie die gut erforschten und verstandenen Membrantransportprozesse bei der Oxygenierung des Hämoglobins. Auch das Fehlen von Zellorganellen und die damit verbundene Simplifizierung von Versuchsergebnissen ist ein ausschlaggebendes Kriterium dafür, dass Erythrozyten das ideale Versuchsobjekt für das Verständnis von Transmembrantransporten, besonders durch Ionenkanäle, sind. (Bouyer G. et al., 2012). Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht zu Kationenkanälen und ihren Eigenschaften, wie sie bis dato auf der Erythrozytenmembran beschrieben sind.

**Tabelle 1.1:** Übersicht von verschiedenen Ionenkanälen auf der Erythrozytenmembran (Stand 2015; Übernommen, übersetzt, aktualisiert und bearbeitet aus: Lars Kaestner; Cation Channels in Erythrocytes - Historical and Future Perspective; The Open Biology Journal, 2011, 4, 27-34)

I. Der Gardos-Kanal		
Eigenschaften	Referenz	Anmerkung
Lokale Membrandeformität führt zur Aktivierung von Gardos-Kanälen	Dyrda A. et al. 2010	Membrandeformität von Erythrozyten führt zu einer Erhöhung der Kalziumionenströme, die sekundär Gardos aktivieren.
Flussmessungsbasierter Beweis	Gardos 1958	Kurzer aber präziser Bericht als „vorläufiger Hinweis“
Messungen mit der Mikroelektrode von $\text{Ca}^{2+}$ -induzierter Hyperpolarisation	Lassen et al. 1974, 1976, Gardos et al. 1976	Gezeigt an Riesen-Erythrozyten von <i>Amphiuma means</i>
Elektrophysiologische Identifikation bei 18 pS (Patch-clamp)	Hamill 1981, 1983	Gezeigt an Frosch-Erythrozyten
Elektrophysiologische Charakterisierung der ein Kanal-Leitfähigkeit, Selektivität für Kaliumionen ( $17:1; \text{K}^+:\text{Na}^+$ ), sowie	Grygorczyk and Schwarz 1983, Grygorczyk et al. 1984, Grygorczyk and Schwarz 1985, Grygorczyk 1987	Alle Messungen an humanen Erythrozyten – inside out patches

Temperaturabhängigkeit		
Ca <sup>2+</sup> -abhängige Öffnung des Kanals, sowie Konzentrationsabhängige Aktion verschiedener Metallionen	Leinders et al. 1992a	2 side by side Artikel, Alle Messungen an humanen Erythrozyten – inside out patches
Molekulare Identität (hSK4)	Hoffman et al. 2003	Western blot von Ghost-Membranen
Leitfähigkeit der gesamten Zelle wurde nicht inaktiviert und inwärts gerichtet für Kaliumionen; Selektivität für K <sup>+</sup> , Rb <sup>+</sup> :Cs <sup>+</sup> :Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , NMDG:NH <sup>4+</sup> war 51:5:>1:0 Inhibition durch: Charybdotoxin (28 nM), Clotrimazole (153 nM), Nitrendipine (27 nM), Stychodactyla toxin (291 nM), Margatoxin (459 nM), Miconazole (785 nM), Econazole (2.4 µM), Cetiedil (79 µM) Aktivierung durch: 1-Ethyl-2-Benzimidazolinone (74 µM)	Jensen et al. 1998	Diese Kanaleigenschaften wurden nicht in Erythrozyten untersucht. Diese Entdeckungen wurden bereits vor der Entdeckung des hSK4 in Erythrozyten gemacht und ließen damit schon auf ein Vorhandensein des Gardos-Kanals in Erythrozyten schließen
<b>II. Niedrig-leitfähige Kationenkanäle</b>		
<b>Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>	<b>Anmerkung</b>
15 pS Einwärtsstrom	Grygorczyk and Schwarz 1983	Lösung in der Pipette, welche an die Zellmembran angebracht wurde mit folgender Konfiguration in mM: 140 KCl, 1 EGTA, 1 MgCl <sub>2</sub> , 10 MOPS
17 pS, Kaliumionen Selektivität	Bennekou and Christophersen 1988	
8.4 pS in physiologischer Ionenstärke, 17 pS bei halbierten Ionenstärke	Kaestner and Bernhardt 2002	Bei inside-out patches (symmetrische 150mM KCl Lösung) konnte bei einem Austausch der Badlösung zu 75 mM KCl keine Veränderung des Umkehrpotentials beobachtet werden
<b>III. Spannungsaktivierte nicht-selektive Kationenkanäle</b>		
<b>Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>	<b>Anmerkung</b>
Hinweise für	Halperin et al. 1989	Die Potentiale wurden

Spannungsaktivität < 40 mV mit Hilfe von Flussmessungen, Permeabilität für $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ und $\text{Ca}^{2+}$ , inhibierbar durch Ruthenium rot		eingestellten durch entweder Änderungen des $\text{K}^+$ -Konzentrationsgradienten in der Anwesenheit von Valinomycin oder durch Änderung der des Anionen Nitrat Konzentrationsgradienten in Anwesenheit von DIDS
Elektrophysiologische Identifikation einer Nullstromleitfähigkeit mit 35 pS mit Steigerung der Offenheitswahrscheinlichkeit bei Spannungen zwischen -30 mV und +30 mV, zwischen 0 und 100%	Christophersen und Bennekou 1991	Messungen fanden in einer symmetrische Salzlösung mit 500 mM statt.
Elektrophysiologische Charakterisierung unter physiologischen Konditionen, Permeabilität für divalente Kationen	Kaestner et al. 1999, 2000	Das Paper von 2000 schlichtet die Diskrepanzen zwischen dem Paper von 1999 und den Versuchen von Christophersen und Bennekou 1991
Acetylcholin Sensitivität	Bennekou 1993	Messungen fanden in einer symmetrische Salzlösung mit 500 mM statt
Hysteretisches Verhalten der Offenheitswahrscheinlichkeit	Kaestner et al. 2000, Bennekou et al. 2004	Diese Eigenschaft wurde ursprünglich durch Patch-clamp Experimente gezeigt und konnte in Zellsuspensionen bestätigt werden
Untersuchungen der gesamten Zelle	Rodighiero et al. 2004	Bestätigung vorheriger Einzelkanal-Messungen
Aktivierung durch Clotrimazole und Analoga; Inhibierung: 30% durch $100\mu\text{M La}^{3+}$ , max. 70% durch Ruthenium rot ( $\text{IC}_{50}$ bei $480\mu\text{M}$ ), 2,4'-Dibromoacetophenone und fallende pH-Werte bis 6.0	Barksmann et al. 2004, Bennekou et al. 2004, 2006	Basierend auf Flusseexperimenten, und durch CCCP-geschätzten Membranpotentialen.
Hinweise für die Identität von $\text{Ca}_v2.1$	Andrews et al. 2002	Western blot von Ghost Membran und typische pharmakologische Eigenschaften bei Durchflusszytometrie mit $\omega$ -agatoxin
Es gibt keine bekannten	Catterall et al. 2005	Diese Eigenschaften wurden

Ca <sub>v</sub> 2.1 Aktivatoren, aber Inhibitor durch $\omega$ -conotoxin MVIIC, Piperidine, substituierte Diphenylpiperidine, Piperazine, volatile Anästhetika, Gabapentin, Mibefradil, Peptidtoxine DW13.3 und $\omega$ -conotoxin SVIB		allerdings noch nicht für Ca <sub>v</sub> 2.1 Kanäle auf Erythrozyten erforscht.
Hochregulation von Plasmodium falciparum infizierten Erythrozyten	Bouyer et. al. 2011	Kanäle nach Invasion für den Parasiten überlebenswichtig. Neue Ziele für pharmakologische Therapie von Malaria
IV. Rezeptoraktivierte nicht-selektive Kationenkanäle		
Eigenschaften	Referenz	Anmerkung
Flussmessungsbasierter Beweis	Li et al. 1996, Yang et al. 2000	Indirekte Messungen der Gardos-Kanal Aktivität (1996), Ca <sup>2+</sup> Flussmessung und FACS mit Fluo-3 Färbung
Aktivierung durch osmotischen und oxidativen Stress	Huber et al. 2001, Duranton et al. 2002	Gezeigt an ganzen Zellen als Erythrozyten Ghosts
Aktivierung durch PGE <sub>2</sub> und LPA	Kaestner and Bernhardt 2002, Kaestner et al. 2004	Zur Zeit der Publikation ging man davon aus, dass dies eine Eigenschaft der spannungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanälen ist, bis heute nicht komplett aufgeklärt
Inhibition durch Ethylisopropylamiloride und EPO	Lang et al. 2003, Myssina et al. 2003	Die Kanalinhibition schützt die Zelle vor Eryptose
V. TRP C6 Kanal		
Eigenschaften	Referenz	Anmerkung
Identifikation durch Western blot	Foller et al. 2008	Bereitgestellt von Flockerzi, M. Meissner and M. Freichel (Saarland University, Germany)
Ca <sup>2+</sup> Einstrom Änderung in humanen Ghost Zellen nach Antikörper Inkubation	Foller et al. 2008	Gezeigt durch FACS Analysen
Nicht-selektive aber hochaffine Liganden für Aktivierung und Inhibition: Aktivierung durch	Abramowitz and Birnbaumer 2009	Review, Kanaleigenschaft nicht speziell für Erythrozyten gezeigt



Phospholipase C Signalweg oder direkt durch Diacylglycerol		
VI. NMDA-Kanal		
Eigenschaften	Referenz	Anmerkung
Wichtige Funktionen bei der Differenzierung von Vorläuferzellen zu reifen Erythrozyten	Hänggi et al. 2015	Überlebens von Polychromatischen Erythroblasten, sowie Kalziumhomöostase von orthochromen Erythroblasten bis zur Differenzierung zu Erythrozyten
Gesteigerte Ausprägung bei Patienten mit Sichelzellanämie mit exzessiver Kalziumionenaufnahme	Hänggi et al. 2014	NMDA als neues Ziel für pharmakologische Therapie der Sichelzellanämie
Identifikation, Western Blot und Immunhistochemie	Makhro et al. 2010	Gezeigt in Ratten- Erythrozyten, besonders ausgeprägt und Retikulozyten und jungen Erythrozyten
Identifikation in humanen Erythrozyten	Bogdanova et al. 2009	Gesteigerte Ausprägung bei Sichelzell-Patienten
Agonisten: L-Glutamat, Glycin, D-2-Amino-5- Phosphonovalerat, 7- Chlorokynurenat; Affinität und Sensitivität hängen von der Zusammenstellung der heterogenen Untereinheiten ab	Yamakura and Shimoji 1999	Kanaleigenschaften nicht an Erythrozyten gezeigt

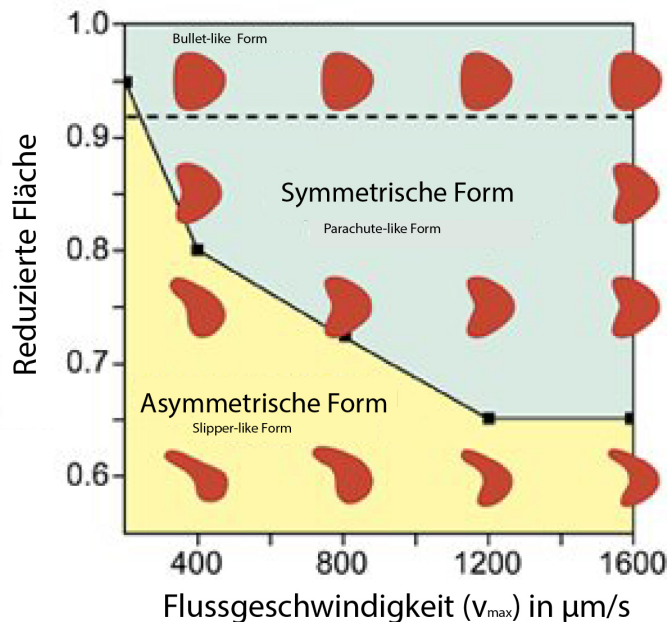
### 1.7.1 Mechanosensitive Kalziumkanäle auf Erythrozyten am Beispiel des Piezo-1-Kanals

Auch Erythrozyten sind während ihrer Zirkulation durch das Kreislaufsystem einem ständigen mechanischen Reiz ausgesetzt. Gerade an Engpässen wie dem Milzsinusoid, wo die Blutmauserung stattfindet oder in den feinsten Kapillarverästelungen der Lunge, wo ein besonders enger Kontakt zwischen Endothel und Erythrozytenmembran entscheidend für die Oxygenierung ist, wirken in besonderem Maße Zug-, Druck- und Scherkräfte. (Dmitry A. et al. 2014). In Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Blutflusses und der Abnahme der Querschnittsfläche des Gefäßes gehen die Discozyten in verschiedene Formen über, die ihnen durch Änderung von Volumen und Elastizität ermöglichen, den energetisch günstigsten Zustand anzunehmen (Stone, H.A. et al., 2009). Abbildung 1.6 zeigt die Formänderung der Erythrozyten in Abhängigkeit von Geschwindigkeit und Gefäßfläche. Diese Formen ermöglichen dem Erythrozyten, sein Volumen der Umgebung anzupassen und somit auch



durch enge Passagen zu gelangen, ohne diese zu verstopfen, was teilweise verheerende Konsequenzen für den gesamten Organismus hätte.

Voraussetzung für die Umsetzung der zuvor genannten Eigenschaften ist das Vorhandensein eines adäquaten Rezeptors, welcher es den Erythrozyten ermöglicht, auf entsprechende Scherkräfte aus der Umwelt zu reagieren.

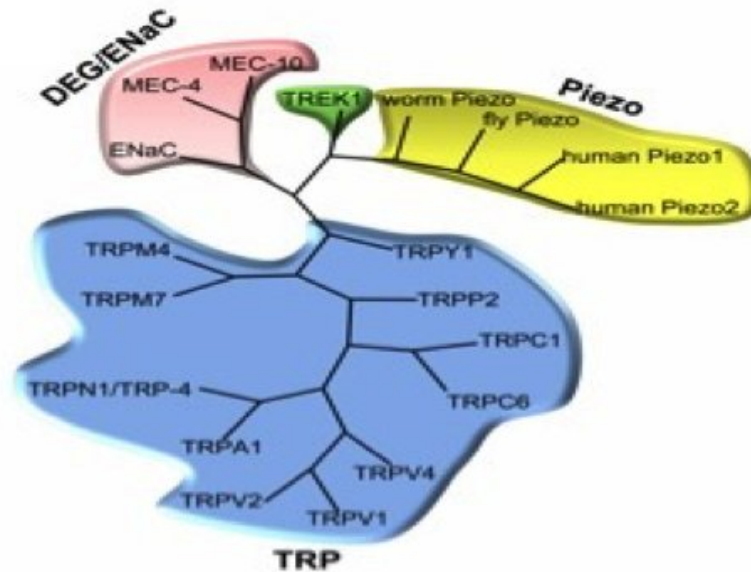


**Abbildung 1.6:** Das Diagramm zeigt die Formänderung von Erythrozyten in Abhängigkeit von der Reduktion des Querschnittes der Gefäßfläche und Flussgeschwindigkeit. Wenn der Querschnitt des Gefäßes groß ist, ändert sich auch bei höheren Fließgeschwindigkeiten die Form kaum (siehe Bullet-like Form). Erst bei Reduktion der Querschnittsfläche geht der Erythrozyt zunächst in eine Fallschirmform (Parachute-like Form) über. Bei weiterer Reduktion bei konstant niedriger Geschwindigkeit, verliert die Zelle an Volumen und nimmt eine Pantoffelform an (Slipper-like Form). Diese volumenreduzierte Pantoffelform wechselt bei Erhöhung der Geschwindigkeit wieder in die Fallschirmform, behält allerdings bei konstant enger Querschnittsflächen ihr reduziertes Volumen bei. (überarbeitet und übersetzt aus Quelle: Viewpoint: Slipping through blood flow Howard A. Stone, Alison M. Forsyth, and Jiandi Wan, Department of Mechanical and Aerospace Engineering, Princeton University, Princeton, NJ 08544, USA October 26, 2009 • Physics 2, 89)

Wie bereits beschrieben, ist die Voraussetzung für die Umsetzung der zuvor genannten Eigenschaften das Vorhandensein eines adäquaten Rezeptors, welcher es den Erythrozyten ermöglicht, auf entsprechende Scherkräfte aus der Umwelt zu reagieren. Wie bereits beschrieben, hängt die durch Membranverformbarkeit im Wesentlichen von der Inhibierung des Proteins Adducin durch, mit Kalzium aktiviertem, Calmodulin ab. Somit ist eine intrazelluläre Erhöhung von freien Kalziumionen, als Antwort auf einen mechanischen Reiz aus der Umwelt, zielführend für die Umsetzung des Reizes auf eine entsprechende Zellantwort.

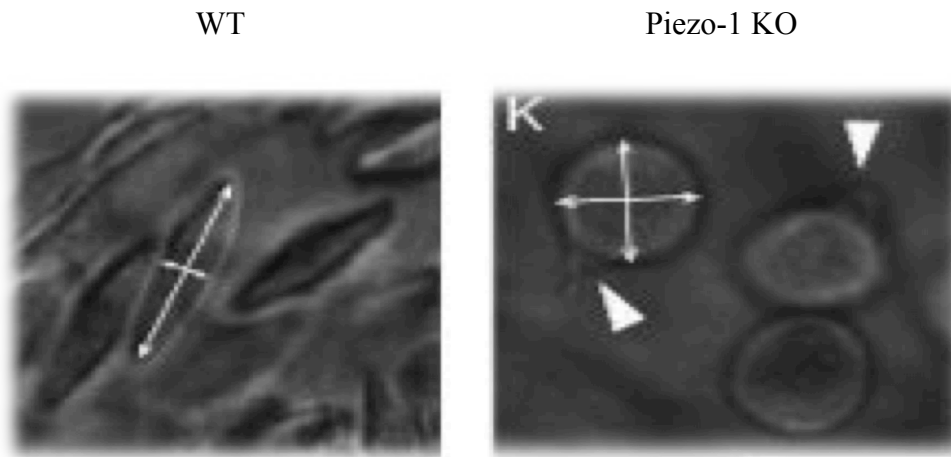
Da Erythrozyten nicht wie beispielsweise Myozyten, über intrazelluläre Kalziumdepots verfügen, muss dieses Kalziumsignal durch einen kontrollierten Einfluss über entsprechende Ionenkanäle stattfinden. Faucherre A. et al. konnten nachweisen, dass der mechanosensitive Kalziumionenkanal Piezo-1 dabei eine entscheidende Rolle spielt. Piezo-1 ist ein stretch-aktivierbarer (engl.: „stretch“ – ziehen/dehnen, meint hier: „auf zug“) mechanosensitiver Kationenkanal, der aufgrund des elektrochemischen Gradienten hauptsächlich Kalzium

transportiert. (Faucherre A. et al. 2013). Die Aktivierung des Kanals kommt dadurch zustande, dass durch Spannungen in der Membran Protein-Protein-Verbindungen in der Membran reversibel reißen und somit den Kanal öffnen (Faucherre A. et al. 2013). In Säugetieren konnten 2 Gene nachgewiesen werden, welche für Piezo kodieren. Fam38A für Piezo-1 und analog dazu Fam38B für Piezo-2 (Xiao R. und Shawn Xu X.Z., 2011). Abbildung 1.7 zeigt die verschiedenen Klassen von Kanälen, für die eine mutmaßliche Mechanosensitivität besteht. Piezo-1 kann durch das Peptid GsMTx-4 inhibiert werden, was durch eine extrazelluläre reversible Bindung passiert und elektrophysiologisch zu einem verminderten Strom bei konstantem Druck führt. (Bae C. et al. 2011)



**Abbildung 1.7:** Dendrogramm-Plot der Familie von mechanosensitiven Ionenkanälen, wie sie bisher in Eukaryonten Zellen gefunden wurden. Außer der Familie der TRP-Kanäle sind nur mechanosensitive Vertreter aufgeführt, wobei nur für TRPN1 eine direkte mechanisch gesteuerte Aktivierung nachgewiesen werden konnte. (Quelle: Xiao R. und Shawn Xu X.Z., 2011)

Am Zebrafischmodell konnten Faucherre A. et al. zeigen, dass durch Knock-out von Piezo-1 sowohl das Volumen als auch die Form der Erythrozyten beeinflusst wurde (Abbildung 1.8). Desweiteren konnten sie zeigen, dass die Zebrafische mit der Mutation im Vergleich zum Wildtyp, eine Anämie aufwiesen, welche auf vermehrte Hämolyse aufgrund von Zellmembranrupturen zurückzuführen war.



**Abbildung 1.8:** Linkes Bild: Erythrozyten eines Wild-Typ Zebrafisches aus einer nativen Weißlichtaufnahme. Das Verhältnis von Länge zu Breite beträgt ca. 3:1 (weiße Doppelpfeile in der Zelle). Das Volumen beträgt  $130 \mu\text{m}^3$ . Das rechte Bild zeigt Zebrafischerythrozyten mit der Piezo-1 KO Tieren. Das Verhältnis von Höhe zu Breite beträgt nahezu 1:1 (weiße Doppelpfeile in der Zelle), das Volumen  $219 \mu\text{m}^3$ . Außerdem fallen beim Piezo-1 KO mikroskopisch sichtbare Membrandefekte auf, was auf eine mangelnde Kompensation von erhöhter Membranspannung bei Zellschwellung hinweist. (Quelle: Faucherre A. et al. 2013).

Zum jetzigen Zeitpunkt konnte die Existenz des Piezo-1 Kanals in Erythrozyten noch nicht einwandfrei durch Western-Blots, immunzytochemische Methoden oder Polymerasekettenreaktionsverfahren (PCR, next generation sequencing) belegt werden (Kaestner, L. 2015). Hauptgründe dafür sind die Nichtexistenz von Zellkernen im reifen Erythrozyten, sowie das Fehlen von Organellen zur Proteinbiosynthese, was den Nachweis von mRNA, welche für Piezo-1 kodiert, unmöglich macht. Außerdem ist es außerordentlich schwierig, reine Erythrozytenisolationen aus Vollblut zu gewinnen, ohne dabei andere Blutzellen zu verschleppen, welche die Ergebnisse von direkten Methoden verfälschen (Minetti et al. 2013). Desweiteren gilt anzunehmen, dass die Konzentration des Piezo-1-Kanals auf Erythrozyten zu gering ist, um sie durch Färbungen oder Blot-Methoden zu detektieren.

Dennoch zeigen Patienten mit einer relevanten Piezo-1 Mutation das klinische Erscheinungsbild einer hereditären Xerocytoze, deren Symptome am besten als Konsequenz des Fehlens von funktionstüchtigen und in ausreichender Zahl vorhandenen Piezo-1-Kanälen auf der Membranoberfläche von menschlichen Erythrozyten zu deuten sind. (Andolfo, I. et al. 2013).

### 1.7.2 Kalziumaktivierte Kationenkanäle am Beispiel des Gardos-Kanals

Der Gardos-Kanal, benannt nach seinem ursprünglichen Entdecker Georges Gardos, ist ein Kalziumsensitiver Kationenkanal. Gardos beschrieb 1956 einen kalziumabhängigen Kaliumionenausstrom aus humanen Erythrozyten, wenn diese oxidativem oder osmotischem Stress ausgesetzt waren und beschrieb dieses Phänomen als Gardos-Effekt (Gardos G. 1956 und 1958). Mit Hilfe der Patch-Clamp Technik konnten Alvarez & Garcia-Sancho 1987 im Schnitt ca. 150 Gardos-Kanäle pro Erythrozyt nachweisen. Als gebräuchliche synonyme Bezeichnungen für den Gardos-Kanal findet man in der Literatur u.a. hSK4-Kanal oder  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanal. Beide Kanalbezeichnungen stammen von verschiedenen vermeintlich neu entdeckten Kanälen, bei denen sich im Laufe der Jahre herausstellte, dass es sich dabei

ebenfalls um den bereits beschriebenen Gardos-Kanal handelte (Bouyer G. et al. 2012). Der Kanal weist eine ausgeprägte Selektivität für Kalium auf und wird durch Erhöhung der intrazellulären freien Kalziumionenkonzentration aktiviert (Siehe Tabelle 1.1). In ruhenden, unstimulierten Erythrozyten liegt die intrazelluläre freie Kalziumkonzentration bei rund 50 nM. Yingst und Hoffman konnten 1984 zeigen, dass bei einer Konzentration von 500 nM die Offenheitswahrscheinlichkeit der Kanäle bei 10% liegt und mit steigender Konzentration bis zu 60  $\mu$ M diese 90% erreicht. Desweiteren konnten Yingst und Hoffman zeigen, dass eine Konzentration von 2-3  $\mu$ M intrazellulärer freier Kalziumionen erforderlich ist um eine adäquate Aktivierung der Gardos-Kanäle zu provozieren. Eine spannungsabhängige Öffnung der Gardos-Kanäle konnte erst bei extrem hohen Spannungen beobachtet werden, so dass nur eine erhöhte Kalziumionenkonzentration für die Aktivierung der Gardos-Kanäle in Frage kommt (Grygorczyk et al. 1984). Auch Aktivatoren des Kalziumkanals wie 1-Ethyl-2-Benzimidazolinon (siehe Tabelle 1.1) wirken über einen erhöhten Kalziumeinstrom in Zellen und somit indirekt über eine Kalziumaktivierung des Gardos-Kanals. Somit wurde der Gardos-Kanal lange Zeit nur mit Pathologien in Verbindung gebracht, die als Mechanismus eine Erhöhung des intrazellulären freien Kalziums aufwiesen, bzw. die besonders bei erhöhtem oxidativem Stress eine entsprechende Klinik aufweisen. Beispielhaft genannt sei hier die Sichelzellanämie, bei der man die Aktivität des Gardos-Kanals hauptsächlich für die Dehydrierung der typischen Sichelzellen verantwortlich macht (Bouyer G. et al. 2012). Verschiedene Inhibitoren, allen voran der selektive  $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Blocker TRAM-34 konnten in verschiedenen Tierversuchsmodellen zeigen, dass eine Inaktivieren des Gardos-Kanals bei gesunden Versuchstieren binnen weniger Wochen zu einer zunehmenden Splenomegalie führte. Analog durchgeführte Versuche mit  $K_{Ca3.1}$  Kanal Knock-Out Mäusen konnten desweiteren zeigen, dass die Erythrozyten makrozytäre Veränderungen, eine verminderte Filtrierbarkeit sowie ebenfalls eine progradiente Splenomegalie aufwiesen (Grgic I. et al. 2009).

### 1.7.3 Rezeptoraktivierte Kalziumkanäle am Beispiel des TRPC 6 Kanals

Rezeptoraktivierte Kationenkanäle sind Transmembranproteine, welche durch Bindung eines intrazellulären oder extrazellulären Liganden an eine entsprechende Bindungsstelle, allosterisch aktiviert werden und somit für Kationen durchlässig werden. Die Bindung kann reversibel oder irreversibel sein und somit je nach Ligand und Rezeptor den Kanal daueröffnen, kurz öffnen und danach wieder schließen oder für eine bestimmte Zeit öffnen und danach deaktivieren.

Der „Transient Receptor Potential Canonical Channel 6“ (TRPC6-Kanal) wurde erstmals 2008 von Föller M. et al. mittels Western Blot auf der Membran von adulten Erythrozyten nachgewiesen. Der TRPC6-Kanal ist ein rezeptoraktivierter Kationenkanal der allerdings auch Eigenschaften eines spannungsaktivierten Kanals ausweist (Bouyer G. et al. 2012).

Der Kanal ist nichtselektiv für Kationen, weist aber einen konkreten Zusammenhang mit dem Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen, besonders in Experimenten mit erhöhtem oxidativem oder osmotischem Stress auf und wird daher mit dem kalziumvermittelten Zelltod von Erythrozyten in Verbindung gebracht (Föller M. et al. 2008).

Als Mitglied der Subgruppe von TRP-Kanälen weist auch der TRPC6-Kanal 6 Transmembrandomänen auf, wobei das C in der Literatur auch für die Bezeichnung klassisch/ursprünglich (engl.: „classical“) gebraucht wird und somit die Form von TRP-

Kanälen beschreibt, die bei frühen Experimenten mit Taufliegen (griechisch.: „*Drosophilidae*“; Gattung: „*Dorsophila*“) erstmals beschrieben wurden. (Montell C., 2005). Verschiedene hochaffine, aber nicht-selektive Aktivatoren und Inhibitoren konnten für den TRPC6 Kanal nachgewiesen werden, wobei viele Substanzen über den Signalweg mit Phospholipase C und somit über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des TRPC6 Kanals mit diesem in Verbindung stehen (siehe auch Tab.1.1). Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) soll hier beispielhaft als Substanz genannt werden, die durch Aktivierung der Phospholipase C den TPRC vermittelten Kalziumeinstrom stimuliert und somit u.a. bei Leukozyten zur Apoptose, aber auch bei Erythrozyten entsprechend zur Eryptose führt (Föller M. et al. 2006). Humanes Erythropoetin (EPO) steht schon seit längerer Zeit im Verdacht durch Interaktion mit dem TRPC6 Kanal selbst, aber auch mit einer Downregulation der Genexpression für TRPC6 Kanäle, den apoptotischen Kalziumeinstrom über TRPC6 zu inhibieren und somit zellprotektiv zu wirken. (Chu X. et al 2003). Auch eine Interaktion und damit verbunden die Existenz anderen TRP-Kanäle insbesondere auf der Erythrozytenmembran konnte bisweilen nicht ausreichend geklärt werden.

### 1.8 Hereditäre Xerozytose

Die hereditäre Xerozytose, auch bekannt unter dem Namen dehydrierte hereditäre Stomatozytose (DHSt), ist ein Formenkreis aus der Gruppe der autosomal dominant vererbten hämolytischen Anämien (Ress, D.C. et al. 2004). Stomatozyten (gr. Stoma = Mund) weisen durch vermehrte Schwellung und eine rigide Zellmembran eine geschwollene Diskusform auf, wodurch der ursprünglich bikonkave, tellerförmige mediale Teil des Erythrozyten zu einem schlitzförmigen Spalt wird. Von einer Stomatozytose, im Sinne der DHSt spricht man, wenn im Blutaussstrich zwischen 10-30% Stomatozyten vorliegen. Weitere Ursachen für Stomatozyten im Blutaussstrichen können eine Alkoholintoxikation mit Folge einer alkoholbedingten Lebererkrankung, sowie Ausstrichfehler beim Anfertigen des Präparates, im Sinne von Druckartefakten, sein (Mitschke R., 2006). Die Ursache der Anämie liegt dabei auf einem Membrandefekt, welcher zu vermehrtem Natriumioneneinstrom in den Erythrozyten, sowie einer vermehrten Abgabe von Kaliumionen nach extrazellulär führt (Andolfo, I. et al. 2015). Andolfo, I. et al. konnten außerdem zeigen, dass eine Piezo-1 Mutation zu eben dieser Krankheit führt, welche klinisch durch eine hämolytische Anämie geprägt ist. Außerdem weisen Patienten mit dieser Mutation in ihrer embryonalen Entwicklung vermehrt Ödembildung bis hin zu einem lebensbedrohlichen Hydrops fetalis auf. Der vermehrte Abbau von Erythrozyten in der Milz führt postnatal zum klinischen Bild der Splenomegalie, mit entsprechend ausgeprägter hämolytischer Anämie, verminderter Erythrozytenlebensdauer, sowie kompensatorisch erhöhter Hämatopoese (Andolfo, I. et al. 2013). Zur symptomatischen Therapie wird oftmals eine Splenektomie durchgeführt, wodurch sich die Symptome der Anämie bessern, es allerdings in der Folge zu vermehrten thrombembolischen Ereignissen bei den splenektomierten Patient kommt (Andolfo, I. et al.). Diese klinischen Beobachtungen lassen mutmaßen, dass Piezo-1 eine entscheidende Rolle bei der Verformbarkeit und damit der Passage von Erythrozyten durch Engpässe spielt. Durch Wegfall der Milz als Filterorgan kann somit zwar die Anämie behandelt werden, allerdings zu dem Preis, dass mehr schlecht verformbare, rigide Erythrozyten im Kreislauf vorhanden sind und hier eine erhöhte Gefahr besteht, besonders enge Passagen zu verstopfen.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit unterteilt sich in zwei Themengebiete mit jeweils mehreren Experimenten. Im ersten Themengebiet geht es darum, durch funktionelle Analysen in Verbindung mit Video-imaging Methoden nachzuweisen, dass mechanosensitive Kationenkanäle auf der Membran von Erythrozyten existieren, die im Wesentlichen dazu beitragen, die intrazelluläre freie Kalziumionenkonzentration zu erhöhen. Durch osmotische und mechanische Stimulation der Erythrozyten sollte erst gezeigt werden, ob es dabei überhaupt zu einem Kalziumioneneinstrom kommt und ob dieser durch Inhibierung der mechanosensitiven Kationenkanäle zum Erliegen kommt. In einem weiteren Schritt sollte gezeigt werden, ob dieser Effekt auch dann relevant ist, wenn der Erythrozyt Engstellen im menschlichen Körper, wie beispielsweise das Kapillarsystem, passiert. Dazu wurden in-vitro Versuche mit Microfluidic Chip Devices (MCD) durchgeführt, die als Kapillarmodelle mit eingebauter Engstelle dienten. Diese Versuche dienten als Grundlage für weitere Versuche an Mausmodellen, die allerdings nicht mehr Teil dieser Arbeit sind. Der medizinische Hintergrund dieser Arbeit zielt auf Patienten mit hereditärer Xerocytoze, einer Sonderform aus dem Kreis der hämolytischen Anämien, ab. Diese Arbeit soll hier zum besseren Verständnis der grundlegenden physiologischen und zellbiologischen Prozesse der kalziumsignalvermittelten Anpassungssituation der Erythrozyten bei mechanischer Reizung beitragen. Der letzte Versuch des ersten Themengebietes hat außerdem zum Ziel, eine Verbindung zwischen mechanosensitiven Kationenkanälen und dem Gardos-Kanal zu zeigen. Hierzu wurde ein bekanntes Verfahren zur Zellfiltration modifiziert und die Filtrierbarkeit von Erythrozyten mit und ohne Inhibierung der mechanosensitiven Kationenkanäle und des Gardos-Kanals gemessen. Dieses Verfahren könnte sich in Zukunft auch als etabliertes Verfahren zur schnellen und kostengünstigen Erstdiagnostik von Erkrankungen eignen, bei denen die Flexibilität bzw. die Anpassung des Volumens der roten Blutzellen pathologisch gestört ist.

Das zweite Themengebiet zielt auf die hormonelle Stimulation von Erythrozyten ab. Hier sollen zum einen die Auswirkungen der Hormone Erythropoetin und Prostaglandin  $E_2$  auf den TRPC6-Kanal der menschlichen Erythrozyten reflektiert werden, zum anderen sollen bestehende Unterschiede von Mauserythrozyten und humanen Spendererythrozyten in der jeweiligen Subtypenverteilung der TRPC-Kanäle funktionell gezeigt werden. Dazu wurden sowohl Erythrozyten von gesunden Spendern, Wild-Typ Mäusen, TRP C4/5 Knock-out Mäusen sowie TRPC Hepta Knock-Out Mäusen verglichen. Entscheidend war hierbei die Änderung der relativen intrazellulären Kalziumionenkonzentration durch hormonelle Stimulation mit EPO und  $PGE_2$ . Die Ergebnisse dieser Experimente sollen Aufschluss darüber geben, ob reife humane Erythrozyten und Mauserythrozyten ähnlich auf die hormonelle Stimulation reagieren und welche Auswirkung das Fehlen von TRP C4/5 Kanälen hat.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verwendete Chemikalien

Bei den Experimenten zu dieser Dissertation wurden die in Tabelle 3.1 aufgelisteten Chemikalien verwendet.

**Tabelle 3.1:** Verwendete Chemikalien

Name	Quelle	Stockkonzentration
CaCl <sub>2</sub>	Roth	1 mM in Aqua dest.
Glucose	Sigma-Aldrich	
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Roth	
Kalium-Hexazyanoferat (III)	Sigma-Aldrich	
Kaliumcyanid	Sigma-Aldrich	
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich	
KCl	Roth	
MgCl <sub>2</sub>	Roth	1 mM in Aqua dest.
NaCl	Sigma-Aldrich	
PBS	Amresco	
Pluronic F-127	Thermo Fisher Scientific	

#### 3.1.2 Verwendete Farbstoffe

Die in den Experimenten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

**Tabelle 3.2:** Verwendete Farbstoffe

Name	Quelle	Stockkonzentration
Calcein Red-Orange	life technologies, DE	1 mM in Pluronic F-127
Fluo-4 AM	life technologies, DE	1 mM in Pluronic F-127

#### 3.1.3 Verwendete Inhibitoren und Stimulanzen

Die in den Experimenten verwendeten Kanalinhibitoren sind in Tabelle 3.3 aufgelistet

**Tabelle 3.3:** Verwendete Inhibitoren

Name	Quelle	Stockkonzentration
GsMTx-4	almone labs, ISR	1 mM in Aqua dest.
TRAM-34	Sigma-Aldrich, USA	1 mM in Aqua dest.
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, USA	1 mM in Aqua dest.
Erythropoetin	Thermo Fisher Scientific, USA	1 mM in Aqua dest.

### 3.1.4 Verwendete Geräte und Materialien

Tabelle 3.4 zeigt eine Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien

**Tabelle 3.4:** Verwendete Geräte und Materialien

Name	Hersteller
1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, DE
10 ml Spritze Injekt	Braun, DE
15 ml, 50 ml Falcon	Greiner Bio-one, DE
21 G Kanüle Microlance 3	BD, IRE
3 ml Spritze Omnifix Solo Lure,	Braun, DE
3-Wege-Hahn	Braun, DE
40x Objektiv CFI Plan Fluor Series	Nikon Instruments Europe B.V., DE
5 ml Eppendorf Tube	Eppendorf, DE
75 cm Verlängerungsschlauch Typ Heidelberg	Braun, DE
Brutschrank Hera Cell 150	Heraeus, DE
C-Plan 4x Objektiv	Leica, DE
Deckgläser	Thermo Fischer Scientific, USA
DMZ Universal Puller	Seitz, DE
EM-CCD-Kamera iXon 887	Andor Technologies, UK
Filterpapier Whatman No. 4	GE Healthcare, UK
Glaskapillare GB150-8P	Science Products GmbH, DE
Inverses Mikroskop Eclipse TE 2000-U	Nikon, Düsseldorf, DE
Konfokales Scansystem VT- Infinity	VisiTech International, Sunderland, UK
Küvetten	Sarstedt, DE
Laser 491 nm und 561 nm	Cobolt, SWE
Mikroperfusor NE-1000 Programmable Single Syringe Pump	New Era Pump Systems, Inc., USA
Photometer: Lambda Bio+	Perkin Elmer, USA
Pipetten	Eppendorf, DE
Safety-Lanzette	Sarstedt, DE
Stauschlauch	Prämeta GmbH, DE
Sterilen Tupfer	Hartmann, DE
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, DE
Vacutainer K2 EDTA,	BD, USA
Vacutainer Saftey-Lok Blood Collection Set 21G	BD, USA
Zentrifugen 2028R, 2019R	Napco, Thermo Fischer Scientific, USA



### 3.1.5 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

- Tyrode: Zusammensetzung (in mM): 135 NaCl, 5,4 KCl, 10 Glucose, 10 HEPES, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, pH 7,35 mit NaOH, 300 mOsmol.
- Drabkinsche Lösung: Zusammensetzung (in mg): 200 Kalium-Hexazyanoferat (III), 50 Kaliumcyanid, 140 Kaliumdihydrogenphosphat. Mit Aqua dest. auf 1 l aufgeschüttet.
- PBS: Zusammensetzung (in mM): 137 NaCl, 2,7 KCl, 10 Phosphatpuffer, pH 7,4, 300 mOsmol.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Ethikvotum und informierte Einwilligung der Spender

Alle nachfolgend beschriebene Versuche, bei denen Blut von humanen Spendern verwendet wurde, wurden von der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt. Die Kennnummer der Studie lautet: **132/08**.

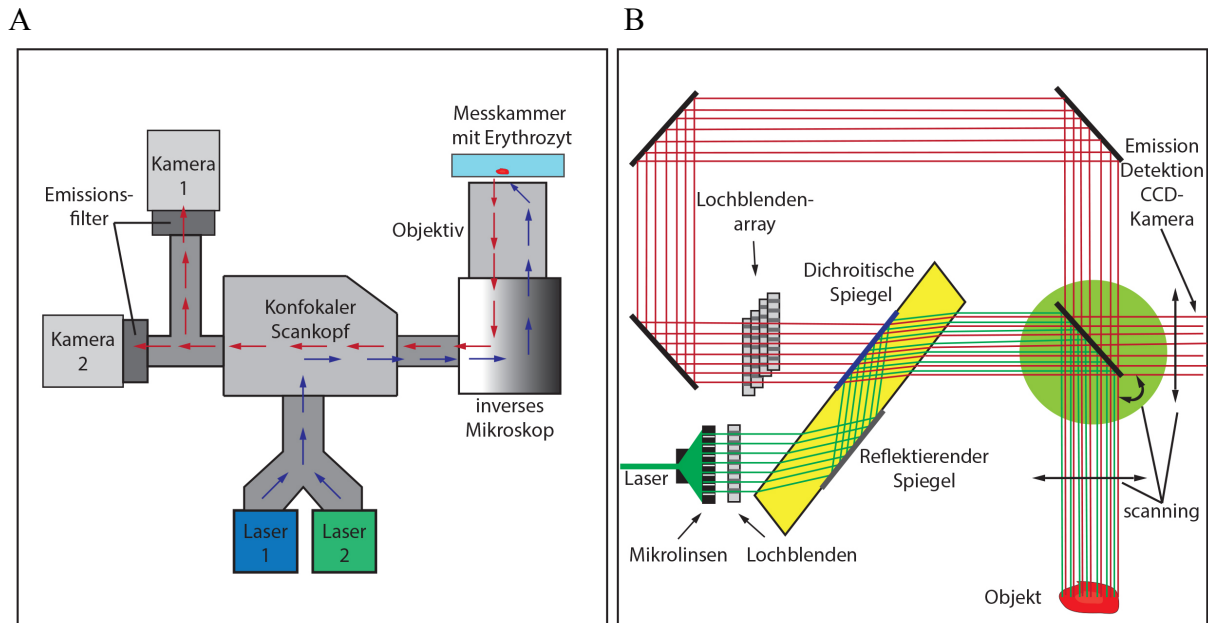
Der Titel der Studie lautet:

**Untersuchung der Kalzium Regulation in Erythrozyten von gesunden Probanden und anämischen Patienten zur Evaluierung der molekularen Mikroskopie als Werkzeug bei der Therapie und personalisierten Medikation seltener Anämien.**

Die Spender wurden über den Verwendungszweck des entnommen Blutes informiert und waren mit der Nutzung für die nachfolgenden Experimente einverstanden. Desweiteren wurden die Spender über Ablauf und potentielle Risiken bei der Blutentnahme aufgeklärt. Die Proben wurden nach der Entnahme anonymisiert. Damit wurde gewährleistet, dass von den erhobenen Daten und Ergebnissen keine Rückschlüsse auf den Spender möglich sind.

### 3.2.2 Mikroskopie mit dem konfokalen Laser-Scan System (VisiTech-VTinfinity)

Die konfokale Laser-Scan Mikroskopie ermöglicht, im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, das Auslesen eines Präparates in einer fokalen Schnittebene, ohne außerfokale Ebenen zu detektieren. (Wilhelm S. et al. 2001) Damit eignet sich diese Technik besonders dazu, lebende Zellen in einer bestimmten Schnittebene zu betrachten, ohne Überlagerungen von Informationen aus anderen Ebenen zu akquirieren. Besonders bei der Beobachtung von Veränderungen und Prozessen, welche sich mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern darstellen lassen, lässt sich so ein besonders kontrastreiches und scharfes Bild generieren. Das konfokale Laser-Scan System wurde an ein inverses Mikroskop (Eclipse TE 2000-U, Nikon, DE) angeschlossen. Laser mit verschiedenen Wellenlängen (Cobolt, SWE) wurden zur Anregung der Fluoreszenzen verwendet. Gekühlte (-50°C) CDD-Cameras (iXon887, Andor Technologie, UK) dienten der Detektion der Emissionen. Die Abstimmung und Zusammenarbeit der Geräte sowie die Verarbeitung der detektierten Signale wurde durch das Programm VoxCellScan (VisiTech International, UK) durchgeführt. Der Aufbau des Mikroskops am Arbeitsplatz sowie das Scanprinzip des konfokalen Scankopfes (VT Infinity, VisiTech International, UK) werden in Abbildung 3.1 gezeigt.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktion des verwendeten Mikroskops.**

A zeigt den Aufbau und die Anordnung der Komponenten am Mikroskopie-Arbeitsplatz mit dem konfokalen Laser-Scan System (VisiTech-VTInfinity). Verschiedene Laser (Laser 1 und 2) senden Licht der entsprechenden Wellenlänge durch den konfokalen Scankopf, welcher das Laserlicht zum inversen Mikroskop schickt, wo es durch das Objektiv auf den Erythrozyten trifft, der das Licht absorbiert (blauer Pfeil). Das daraufhin emittierte Licht des roten Blutkörperchens durchläuft wiederum das Objektiv und das Mikroskop, wird vom konfokalen Scankopf aufgearbeitet (siehe B) und zur Detektion an Kameras weitergeleitet (rote Pfeile). Die Emissionsfilter dienen dazu, Licht anderer Wellenlängen, als der Gewünschten, rauszufiltern. B zeigt schematisch den Aufbau und die Funktionsweise des konfokalen Scankopfes. Die grünen Linien stehen für das Anregungslicht des Lasers, die roten Linien für die Emission des angeregten Objekts. Der Laserstrahl wird zuerst aufgeweitet und durch Mikrolinsen und Lochblenden geschickt, wodurch 50 x 50 parallel angeordnete Strahlen entstehen. Der dichroitische Spiegel reflektiert das Anregungslicht, welches auf einen zweiseitigen Spiegel trifft, der in schnellen Pendelbewegungen das zu scannende Objekt abfährt. Das vom Objekt emittierte Licht wird zum beweglichen Spiegel zurückgeworfen und passiert den dichroitischen Spiegel. Durch ein Lochblenden-Array werden wiederum nur die parallelen Strahlen durchgelassen und über Spiegel auf die Rückseite des pendelnden Spiegels zur Detektion an die CDD-Kameras gesendet. Aufgrund der Geschwindigkeit des Lichtes, kann davon ausgegangen werden, dass das Anregungslicht, das emittierte Licht sowie das Licht, welches zur Kamera gesendet wird den beweglichen Spiegel immer zur gleichen Zeit, also auch in der selben Stellung des Spiegels erreichen. (Quelle: Lars Kaestner, 2013)

### 3.2.3 Imaging von Erythrozyten

#### 3.2.3.1 Gewinnung und Anfärben der Erythrozyten bei humanen Spender

Die Fingerbeere eines gesunden humanen Spenders wurde gründlich mit alkoholischem Hautantiseptikum (octeniderm®, schülke, DE) desinfiziert, abgetupft und anschließend mit einer Safety-Lanzette (Sarstedt, DE) eingestochen. Die Blutung wurde durch sanften Druck gefördert und der erste Blutstropfen wurde verworfen. Nachfolgend wurden 5 µl des kapillaren Blutes mit einer Pipette abgesaugt, mit 1 ml Tyrode verdünnt, um die Gerinnung zu vermeiden und sofort für 3 Minuten bei 1000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das Erythrozytenpellet wurde erneut mit 1 ml Tyrode aufgefüllt und vermischt. Danach wurde die Probe erneut zweimal bei 1000xg für jeweils 3 Minuten

zentrifugiert und der Überstand verworfen und neu mit 1 ml Tyrode aufgefüllt. Die gewaschene Erythrozytensuspension wurde anschließend mit 5  $\mu\text{M}$  des Kalzium-Markers Fluo-4 AM (life technologies, DE) für eine Stunde bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Probe abschließend dreimal bei 1000xg für 3 min gewaschen, um den Marker aus dem Überstand zu entfernen. Die Proben wurden im Anschluss sofort für Experimente verwendet. Außerdem musste darauf geachtet werden, die Proben lichtgeschützt zu behandeln, damit der fluoreszierende Marker nicht ausbleicht.

### 3.2.3.2 Einstellungen des Mikroskops zur Kalziumdetektion in Erythrozyten

Um die mit dem fluoreszierenden Kalziummarker Fluo-4 inkubierten Zellen optimal zu detektieren und dabei trotzdem den Hintergrund so dunkel wie möglich zu halten, haben sich während der ersten Versuche die in Tabelle 3.5 zusammengefassten Einstellungen als sinnvoll erwiesen. Diese Einstellungen gelten nur für die Kalziumsignalmessung bei Änderung der Osmolarität, wurden aber als Basis für jede Messung in der Probephase der einzelnen Experimente angenommen und entsprechend an die Aufnahmegeschwindigkeit und, bei sich bewegenden Zellen im Microfluidic Chip Device (MCD), an die Durchflussgeschwindigkeit der Zellen angepasst.

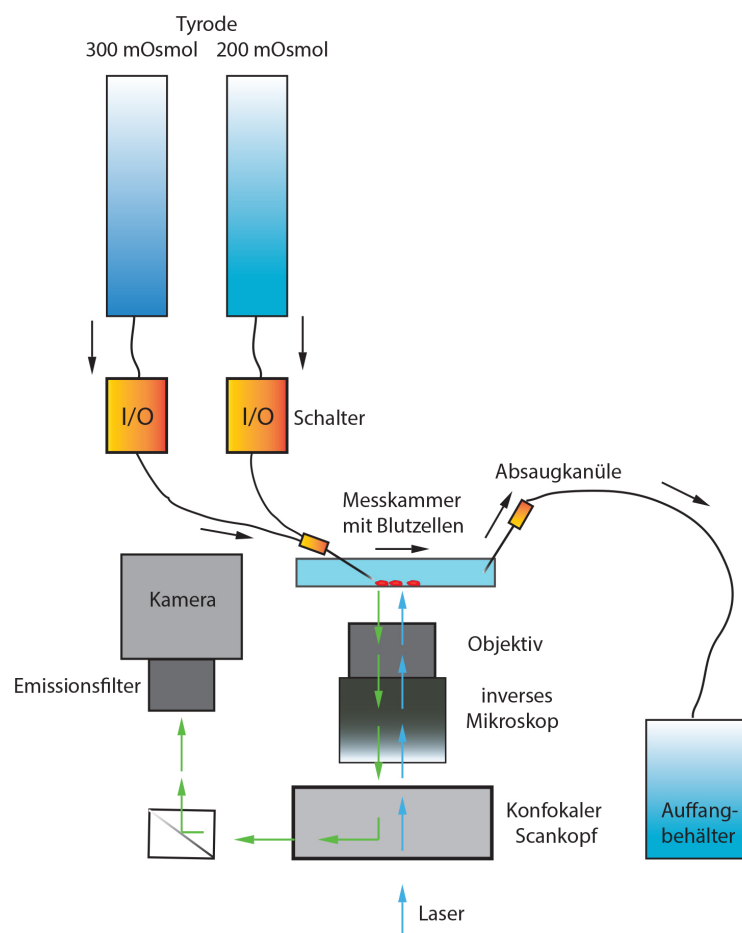
**Tabelle 3.5:** Grundeinstellungen des Mikroskops bei der Kalziumdetektion

Kamera-Einstellungen:	Konfokal-Einstellungen	Exzitation
Belichtungszeit: 2000 ms	Scan-Modus: Fluoreszenz	Laser: 491 nm
Binning: 1x1	Filter: 500 nm LP	Laserstärke 20-40 %
Pixel read-out: 10 MHz	Primärer dichroitischer Filter (Primary Dichroic): 488 nm	
Clipping: full	Konfokale Apertur: 64 $\mu\text{m}$	
EM-Verstärkung: 180		
Vorverstärkung: 2,4		

### 3.3 Durchführung der Kalziumsignalmessung bei Änderung der Osmolarität

100  $\mu\text{l}$  der zuvor mit Fluo-4 AM (life technologies, DE) beladenen humanen Erythrozytensuspension wurden zusammen mit 1 ml Tyrode auf ein, in einer Messkammer eingespanntes, Deckglas gegeben und lichtgeschützt für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Zellen zum Deckglas (Thermo Fischer Scientific, USA) absinken konnten und gleichzeitig das Fluo-4 AM in den Zellen deesterifiziert wurde. Unter Mikroskopsicht wurden eine Zulaufkanüle so an den Blickfeldrand positioniert, dass bei Umschalten des Schwerkraftperfusorsystems eine direkte Änderung der Osmolarität im Blickfeld gewährleistet wurde, d.h. sich die Zellen im laminaren Fluss befanden aber nicht weggespült wurden. Das Schwerkraftperfusionssystem umfasst zwei verschiedene Spritzen mit isoosmolarer ( $\sim 300$  mosmol) und hypoosmolarer Tyrode ( $\sim 200$  mosmol). Beim Befüllen der Spritzen wurde darauf geachtet, dass beide Zylinder in der gleichen Höhe und mit demselben

Volumen befüllt wurden, um die gleiche Flussgeschwindigkeit zu generieren. Über einen Schalter können beide Spritzen unabhängig voneinander sofort geöffnet und geschlossen werden. Beim Aufbau ist stets darauf zu achten, dass das gesamte System frei von Luftblasen ist. Abbildung 3.2 zeigt den Aufbau des Perfusionssystems. Vor Beginn der Messung wurde ein Vorlauf mit isoosmolarer Tyrode von 5 min durchgeführt, um Messfehler durch den einsetzenden Flüssigkeitsstromes und dessen Wirkung auf die Zellen zu vermeiden. Nach dieser Vorlaufzeit startete die Messung automatisch. Nach der ersten Minute wurde über den Schalter die isoosmolare Tyrode aus und gleichzeitig die hypoosmolare Tyrode angeschaltet, um Schwankungen durch Änderungen der flussbedingten Druckverhältnisse zu vermeiden und somit nur den Kalziumeinstrom durch die Änderung der Osmolarität zu detektieren. Die hypoosmolare Lösung wurde 4 min zugeführt, die Messung erfolgte mit einer Bildwiederholrate von 12 Bildern pro Minute für eine Gesamtdauer von 5 min.



**Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau des Perfusionssystems zur Kalziumsignalmessung bei Änderung der Osmolarität.** Je eine Spritze mit isoosmolarer (~300 mOsmol) und hypoosmolarer (~200 mOsmol) Tyrode sind über ein Schlauchsystem mit der Messkammer verbunden. Die Kanüle wird so in der Messkammer positioniert, dass sie am Rande des Sichtfeldes liegt, um eine direkte lokale Änderung der Osmolarität zu gewährleisten. Die Schalter lassen ein schnelles Umschalten zwischen den verschiedenen Lösungen zu. Die Absaugkanüle ist am Rand der Messkammer so positioniert, dass ein Überlaufen verhindert wird, ohne dass der Boden der Kammer austrocknet. Ein Auffangbehälter sammelt die überflüssige abgesaugte Lösung. Die schwarzen Pfeile geben die Flussrichtung an. Die fluoreszenzmarkierten Erythrozyten werden mit einem 491 nm Laser (Cobolt. SWE) angeregt (blaue Pfeile). Fluo-4 hat ein Emissionsspektrum mit einem Maximum bei 506 nm, welches durch die Kamera iXon887 (Andor Technologie, UK) detektiert wird (grüne Pfeile). Der Emissionsfilter vor der Kamera selektiert Wellenlängen im Bereich von 525/50 nm.

### 3.3.1 Inhibition der mechanosensitiven Kalziumkanäle und Kontrollen

In weiteren Messungen, wie oben beschrieben, wurden sowohl zu der Zellsuspension, als auch zur isoosmolaren und hypoosmolaren Tyrode je 2,5  $\mu\text{M}$  GsMTx-4 (almone labs, ISR) hinzugefügt. GsMTx-4 ist ein Inhibitor für mechanosensitive Kationenkanäle, wie Piezo 1. (Bae C. et al. 2011) Als Kontrolle wurde der Versuch zusätzlich in zwei weiteren Varianten durchgeführt. Bei der ersten Variante wurde die isoosmolare Lösung über den kompletten Beobachtungszeitraum von 5 min unverändert zugeführt. Bei der zweiten Variante wurde die isoosmolare Tyrode mit 2,5  $\mu\text{M}$  GsMTx-4 ebenfalls unverändert über 5 min über das Perfusionssystem zugeführt. Diese Kontrollversuche waren nötig, um eventuelle Stimulation durch Faktoren von außen oder durch den Inhibitor selbst auszuschließen und somit zu zeigen, dass jegliche Änderung des Kalziumsignals nur von Änderungen in der Umgebungsmolarität abhängen.

### 3.4 Durchführung der Kalziumsignalmessung bei direktem mechanischem Druck

Die unter 3.2.3.1 beschriebene Zellsuspension wurde parallel zur Anfärbung mit 5  $\mu\text{M}$  Fluo-4 AM (life technologies, DE) zusätzlich mit 5  $\mu\text{M}$  Calcein Red-Orange AM (CRO, life technologies, DE) für eine Stunde inkubiert und danach 3 mal bei 1000xg gewaschen. CRO ist ein zytosolischer Zellmarker, der unabhängig vom Kalziumgehalt der Erythrozyten ist. In intakten Zellen bleibt somit das durch CRO gemessene Signal konstant. Eine Abnahme dieses Signals würde auf eine Membranschädigung der Zelle schließen, was eine kanalvermittelte Kalziumsignaländerung unmöglich macht und diese Zelle somit für die Messung und spätere Auswertung unbrauchbar macht. Um gleichzeitig die Fluoreszenz des Fluo-4 und CRO Farbstoffes anzuregen und aufzeichnen zu können, wurden am System entsprechend zwei verschiedene Laser und zwei verschiedene Kameras angeschlossen. Tab. 3.6 zeigt die entsprechenden Absorptions- und Emissionsmaxima der Farbstoffe sowie die jeweils verwendeten Filter und Laser. Um Bleichen und Autofluoreszenzphänomene zu vermeiden wurde die Laserstärke in den Versuchen so gering wie möglich gehalten.

**Tab 3.6.** Spektren verwendeter Farbstoffe, Laser und Filter

Farbstoff	Absorptionsmaximum	Laser	Emissionmaximum	Emissionsfilter
Fluo-4 AM	488 nm	491nm	506 nm	525/50 nm
Calcein Red-Orange AM	577 nm	561nm	590 nm	628/40 nm

Haugland, R. P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. (Molecular Probes, 2002).

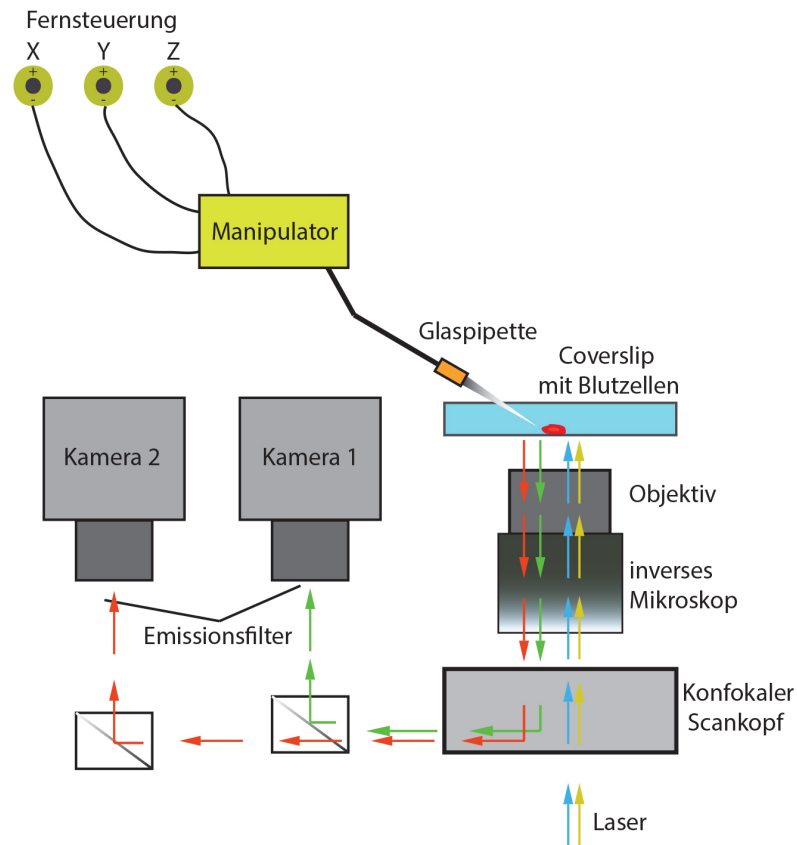
Zum Antippen der Erythrozyten wurde eine Glaspipette verwendet. Diese wurde mit einem DMZ Universal Puller (Seitz, DE) aus einer GB150-8P Glaskapillare (Science Products GmbH, DE) im Single-Pull-Modus gezogen. Tabelle 3.7 zeigt die Einstellungen am Puller.

**Tab 3.7.** Einstellungen zur Herstellung der Glaspipetten am DMZ Universal Puller

Funktion/Einstellung	Wert
H = Heat	450 (in °C)
F(TH) = Force Prepull	40
S(TH) = Distance threshold	23 (in 0,12 mm)
t(H) = Delay heatstop	52 (in 0,5 ms)
s(H) = Distance heatstop	40 (in 0,12 mm)
Adjustierung: x = 1 -> niedrige Hitze beim letzten Pull y = 2 -> Anzahl der vorbereitenden Pulls z = 1 -> niedrigere Hitze während des Glattschleifens	

Es entstanden Pipetten mit der Öffnung von  $\sim 0,5 \mu\text{m}$ . Anschließend wurden die Pipetten mit Tyrode blasenfrei gefüllt und mit einem Gummipfropf am zur Spitze distal liegenden Ende verstopft, um Kapillareffekte und somit das Ansaugen von Zellen oder Tyrode zu vermeiden. Die Pipette wurde danach in einen hydraulischen Mikromanipulator mit Fernsteuerung und Beweglichkeit in X-, Y-, und Z-Richtung eingespannt und vorsichtig zum Bildrand unter Durchlichtbeleuchtung navigiert. Nach Auffinden einer geeigneten Zelle wurde die Pipette in unmittelbare Nähe zur Zelloberfläche gebracht, das Weißlicht abgeschaltet und im Fluoreszenzmodus die Messung begonnen. Zu Beginn der Messung wurde die Pipette so an die Zelloberfläche herangeführt, dass die Oberfläche sichtbar eingedrückt wurde, ohne die Zelle zu bewegen. Damit wurde sichergestellt, dass auf jede gemessene Zelle ein vergleichbarer äußerer Druck aufgebaut wurde. Die Messdauer pro Zelle betrug 20 Sekunden, wobei nach 2 Sekunden die Pipette die Zelle berührte und die Position der Pipette danach nicht mehr verändert wurde, um Bewegungsartefakte zu minimieren. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 5 Bilder/s mit.

Neben der Zellintaktheit, wurde die CRO-Färbung außerdem dazu benutzt, die durch Verformung der Zelle beeinflusste Änderung des Fluo-4 durch u.a. Überlagerungsartefakte sichtbar und messbar zu machen und durch korrigieren des Fluo-4 Signals um das CRO-Signal diese Artefakte später zu eliminieren. Abbildung 3.3 verdeutlicht den oben beschriebenen Versuchsaufbau.



**Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Pipetten-Mikromanipulators mit eingeleiteter Glaspipette und Kamerasystem.** Über die Fernsteuerung lässt sich der Mikromanipulatorarm beliebig in X-, Y-, und Z-Richtung frei bewegen. Die Pipette kann somit vor Versuchsbeginn in die Nähe der zu messenden Zelle geführt werden. Laser der Wellenlänge 491 nm (blaue Pfeile) und 561 nm (gelbe Pfeile) stimulieren die mit Fluo-4 und CRO angefärbten Zellen. Diese geben daraufhin Emissionen mit den Fluoreszenzmaxima bei 506 nm (grüne Pfeile) und bei 590 nm (rote Pfeile) ab. Die Emissionen werden über das konfokale Mikroskopsystem an die Detektionskameras (iXon887, Andor Technologie, UK) weitergeleitet. Kamera 1 soll die Emission von Fluo-4 detektieren, Kamera 2 davon getrennt die Emission von CRO. Dazu wurden entsprechende Emissionsfilter vorgeschaltet, die jeweils die Wellenlängen im Bereich der Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe selektieren.

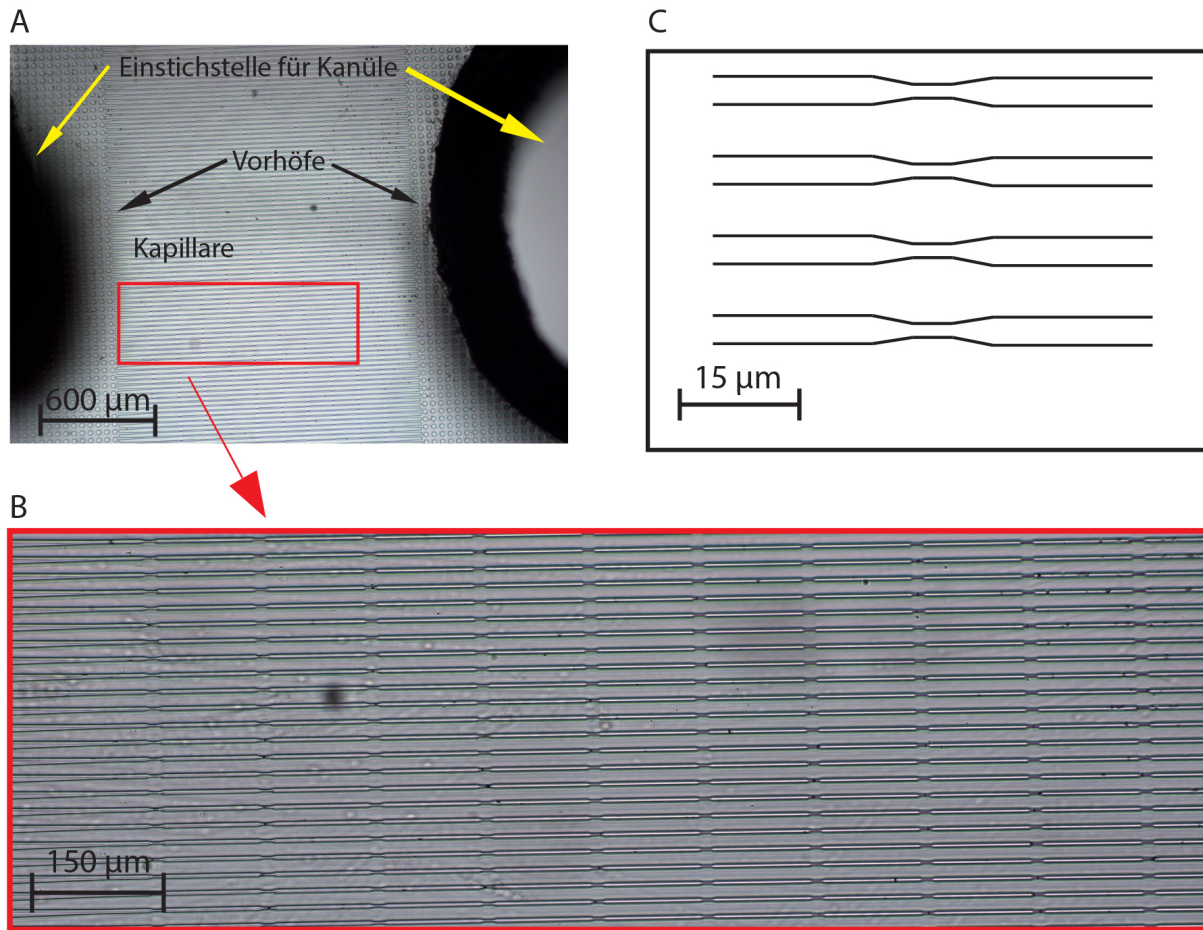
Die Messung von mechanosensitiven Kalziumsignalen unter Einfluss des Inhibitors für mechanosensitive Kationenkanäle GsMTx-4 (almone labs, ISR) erfolgte analog zum beschriebenen Versuchsaufbau. Sowohl der Zellsuspension als auch der Tyrode wurden 2,5  $\mu\text{M}$  GsMTx-4 zugefügt.

### 3.5 Vorbereitung und Aufbau der Kalziumsignalmessung in Erythrozyten mit Kapillarmodellen (Microfluidic Chip Device)

Ein Microfluidic Chip Device (MCD) ist ein mit Silikongelen (Polydimethylsiloxane) ausgegossenes Modell eines Kapillarsystems. Die Chips wurden im Rahmen einer Kooperation von der Arbeitsgruppe von Prof. jun. F. Lautenschläger (Experimentelle Physik, Universität des Saarlandes, DE) entwickelt und bereitgestellt. Jedes MCD verfügt über mehrere Kanalsysteme mit verschiedenen langen eingearbeiteten Engstellen in den parallel verlaufenden Kapillaren. Ein System besteht aus 100 Kapillaren mit jeweils 10 hintereinandergeschalteten Engstellen. Abb. 3.4 A zeigt eine Übersichtsaufnahme eines



Systems, Abb. 3.4 B eine Mikroskopische Aufnahme des MCD sowie Abb. 3.4 C eine schematische Darstellung der Engstellen.



**Abbildung 3.4: Aufbau eines Microfluidic Chip Device (MCD).** A Zeigt eine Übersichtsaufnahme des parallel verlaufenden, linearen Kapillarsystems, aufgenommen mit einem C-Plan 4x Objektiv (Leica, DE) im Weißlichtmodus. Die gelben Pfeile markieren die Einstichstellen, welche über 18 G Kanülen für den Zu- und Ablauf von Flüssigkeiten und Suspensionen im System dienen. Dem „Kapillarbett“ ist auf jeder Seite ein Vorhof vorgeschaltet, um die Einstichstelle mit den einzelnen Kapillaren zu verbinden (schwarze Pfeile). Die einzelnen parallel verlaufenden Kapillaren sind in B mit einem C-Plan 10x Objektiv (Leica, DE) vergrößert dargestellt (roter Kasten und Pfeil von A nach B). Zu erkennen sind hier die hintereinander angeordneten Engstellen mit einer Länge von 15 µm und einer Breite von 3 µm. C zeigt eine schematische Zeichnung von vier parallel verlaufenden Kapillaren mit je einer Engstelle.

Die MCD wurden bis zur Vorbereitung und Durchführung der Versuche mit Tyrode überdeckt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Eine 10 ml Spritze (Injekt, Braun, DE) wurde mit Tyrode gefüllt. Danach wurde ein 75 cm Verlängerungsschlauch (Typ Heidelberg, Braun, DE) und eine 21 G Kanüle (Microlance 3, BD, IRE) mit der Spritze verbunden und alles zusammen blasenfrei entlüftet. Die Spritze wurde in einen Mikroperfusor (NE-1000 Programmable Single Syringe Pump, New Era Pump Systems, Inc., USA) eingespannt. Von der 21 G Kanüle wurde der Schliff mit einer Zange entfernt, danach wurde die Kanüle in die Einstichstelle eingelegt. Durch die größere Kanüle (Einstichstelle 18 G, Kanüle 21 G) konnte das System im Stichkanal luftdicht verschlossen werden, was dafür sorgte, dass die Tyrode nicht an der Einstichstelle wieder austritt. Der Perfusor wurde eingeschaltet und mit 5 µl/min Vorschub für 20-30 min gestartet, um das System blasenfrei zu spülen. Bei diesem Spülvorgang wurde besonders darauf geachtet, dass die im System befindlichen Luftblasen



verschwanden und dass die Flüssigkeit nur an der Einstichstelle austrat, die als Ausgangsstelle diente. Der Überlauf an der Austrittsstelle wurde regelmäßig bei Bedarf mit Filterpapier aufgesaugt. Dieser langsamere Spülvorgang diente dazu, die Flüssigkeitsströme und Druckverhältnisse im System den Verhältnissen während der Messung anzupassen. Nach dem Spülvorgang wurde der Perfusor neu justiert und bei einem Vorschub von 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 10 min wieder mit dem Chip verbunden.

### **3.5.1 Durchführung der Kalziumsignalmessung in Erythrozyten mit Kapillarmodellen**

Die Erythrozyten wurden wie unter 3.2.3.1 beschrieben, von gesunden Spendern gesammelt, gewaschen und mit 5  $\mu\text{M}$  Fluo-4 AM (life technologies, DE) angefärbt. 1 ml dieser Erythrozytensuspension in Tyrode wurde eine Spritze über die Kanüle eingesaugt und danach wurde die Spritze in den Perfusor eingespannt, mit der Einstichstelle verbunden und mit einem Vorschub von 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  gestartet. Das Mikroskop wurde im Durchlichtmodus mit dem 40x Objektiv (CFI Plan Fluor Series, Nikon Instruments Europe B.V., DE) so eingestellt, dass die erste Engstelle in einer Kapillare von Seiten der Zuflussstelle fokussiert wurde. Diese erste Engstelle wurde als Messstelle ausgesucht, da hier die Erythrozyten die Engstelle das erste Mal passieren und somit noch nicht durch vorgeschaltete Engstellen beeinflusst wurden. Es wurde außerdem stets darauf geachtet, dass die Kapillare frei durchgängig war, da sonst kein konstanter Durchfluss möglich gewesen wäre. Wenn eine Kapillare während des Versuches verstopfte, wurde auf eine andere gewechselt und diese Messung verworfen. Nach 5-10 min konnte man erste Erythrozyten detektieren, welche die Kapillaren passierten. Je nach Geschwindigkeit der Erythrozyten wurde der Vorschub am Perfusor so angepasst, dass an der eingestellten Kapillare der einzelne Erythrozyt gut erkennbar war und eine Geschwindigkeit von  $\sim 10 - 15 \mu\text{m}/\text{s}$  erreichte. Das Mikroskop wurde in den Fluoreszenzmodus umgeschaltet und die, mit dem Kalziummarker gefärbten, Erythrozyten mit einem Laser der Wellenlänge 491 nm (Cobolt, SWE) angeregt. Die Emission des Farbstoffes wurde, wie in Abbildung 3.1 konfokalmikroskopisch detektiert.

Die Durchführung der Kalziumsignalmessung mit dem Inhibitor für mechanosensitive Kalziumkanäle GsMTx-4 (almone labs, ISR) verlief analog zum beschriebenen Versuch. Hier wurde lediglich zur verwendeten Zellsuspension verschiedene Konzentrationen GsMTx-4 (0,1  $\mu\text{M}$  – 2,5  $\mu\text{M}$ ) hinzugefügt.

## **3.6 Filtrierbarkeit von Erythrozyten**

### **3.6.1 Blutentnahme und Aufbereitung zu Serum und Erythrozytensuspension**

Einem gesunden humanen Spender wurden 9 ml venöses Blut, vorzugsweise aus der Vena mediana cubiti, nach Aufklärung und Zustimmung entsprechend des bereits beschriebenen Ethikvotums, entnommen. Dazu wurde der Oberarm mit einem Stauschlauch (Der grüne Stauer, Prämeta GmbH, DE) umschlungen und zugezogen um die Venen peripher des Schlauches anzustauen. Der Bereich um die zu punktierende Vene wurde gründlich und mindestens für 30 Sekunden mit alkoholischem Hautantiseptikum (octeniderm®, schülke, DE) desinfiziert. Die Haut wurde mit einem sterilen Tupfer (Pur-Zellin steril, Hartmann, DE) vom Punktionsort nach Peripher getrocknet und danach erfolgte die Venenpunktion mittels Punktionsystem (Vacutainer Saftey-Lok Blood Collection Set 21G, BD, USA). Das Blut

wurde in einem Röhrchen mit EDTA (Vacutainer K2 EDTA, BD, USA) gesammelt und gut geschüttelt. Der Stauschlauch wurde anschließend entfernt, die Punktionsnadel gezogen und

die Einstichstelle mit einem Pflaster versorgt. Das Blutröhrchen wurde für 20 min bei 1000xg zentrifugiert. Dadurch teilte sich das Blut in eine Erythrozytenschicht und eine darüber liegende Plasmaschicht. Durch diese Schichtung ist es möglich Plasma und Erythrozyten getrennt voneinander abzupipettieren. Die Plasmaschicht wurde abpipettiert und im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Das verbliebene Erythrozytenkonzentrat wurde im Verhältnis 1:1 mit Tyrode aufgefüllt und dreimal bei 1000xg für 5 min gewaschen.

### **3.6.2 Aufbau und Zusammensetzung des Filters**

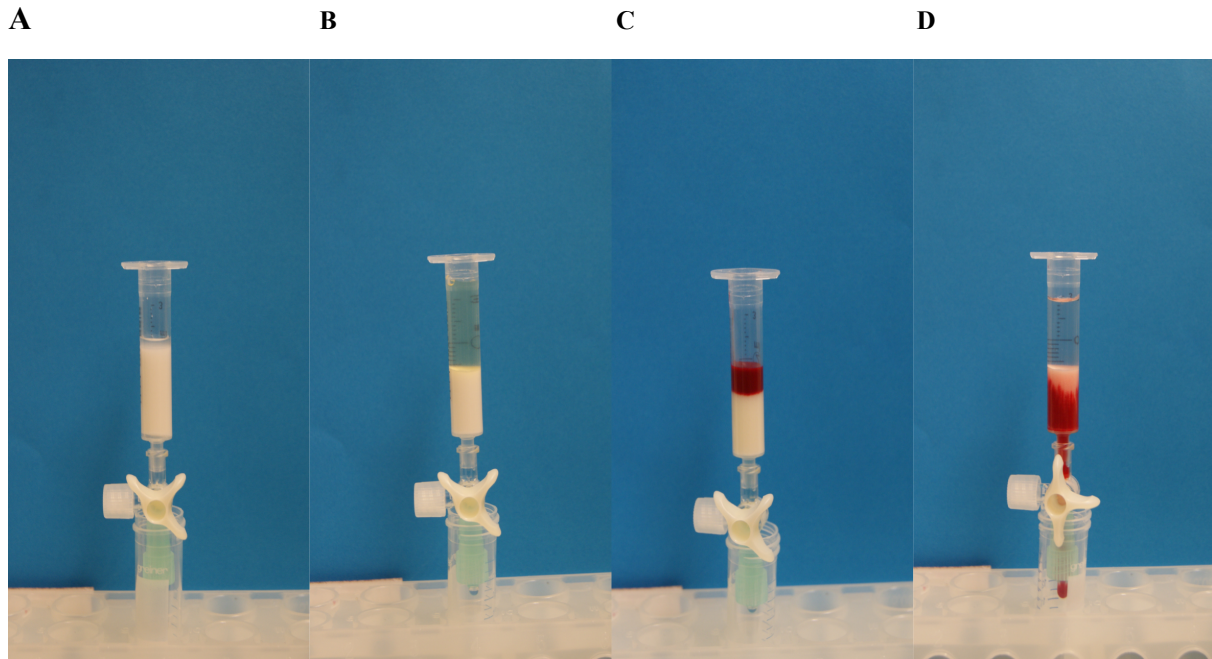
Um die Filtrierbarkeit des Blutes zu messen wurde eine Methodik gewählt und modifiziert welche ursprünglich von Beutler et al. 1976 zur Depletion von Leukozyten aus humanem Vollblut entwickelt wurde. Da im hier beschriebenen Versuch allerdings nicht die Leukozytenfreiheit des Filtrates, sondern die Menge der filtrierten Erythrozyten pro Zeit eine Rolle spielen, wurde die Zusammensetzung des Zellulosefilters variiert und der gesamte Versuchsaufbau um eine zeitliche Komponente ergänzt. In eine 3 ml Spritze mit zentrischem Ausfluss (Omnifix Solo Lure, Braun, DE) wurde ein ausgestanztes Filterpapier (Whatman No. 4 GE Healthcare, UK) eingelegt und mit dem Kolben auf dem Boden der Spritze verpresst. Anschließend wurde der Kolben entfernt und die Spritze mit 200 mg Sigma- und 100 mg Alpha-Zellulose befüllt. Der Kolben wurde wieder aufgesetzt und die Cellulose geschüttelt, damit sie sich vermischt. An die Spritze wurde ein 3-Wege-Hahn (Discofix C 3SC, Braun, DE) angeschlossen und so eingestellt, dass der parallele Durchlauf geöffnet und geschlossen werden kann, ohne den Seitenarm zu öffnen.

### **3.6.3 Zeitlich gesteuerte Filtration von Erythrozyten**

Im Versuchsverlauf hatte sich gezeigt, dass die Beurteilung, wann der erste Blutstropfen den Filter passiert, sehr subjektiv war. Diese Subjektivität liegt darin begründet, dass die makroskopische Rotfärbung des Filtrates von Tropfen zu Tropfen langsam und stetig zunimmt und somit die Wahl des Zeitpunktes wann der erste Blutstropfen filtriert wurde, sehr von der Beurteilung des Betrachters abhängt. Deshalb wurde der Versuch unter festen zeitlichen Grenzen durchgeführt um eine objektive und reproduzierbare Aussage über die Filtrierbarkeit ermöglichen zu können. Die Durchführung mit entsprechenden zeitlichen Parametern wird nachfolgend beschrieben.

In die nach unten geschlossene Spritze wurden 2 ml Tyrode eingefüllt, mit der Zellulose gut geschüttelt, durchmischt und anschließend die Spritze für 2 min geöffnet, damit die Tyrode komplett ablaufen kann und sich die Zellulose als Filterschicht am Boden absetzt. In die danach geschlossene Spritze wurden 2 ml des verdünnten Plasmas vorsichtig eingefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Löcher in den Filter gespült wurden. Der 3-Wege-Hahn wurde für 3 min geöffnet, damit das Plasma in den Filter einziehen konnte und überschüssiges Plasma abließ. Nach erneutem Schließen der Spritze wurden vorsichtig 500 µl des zu filtrierenden Blutes in die Spritze eingelassen und die Spritze für 1 min geöffnet um das Blut in den Filter einziehen zu lassen. Dabei war darauf zu achten dass die Blutschicht nach einer Minute komplett in den Filter eingezogen war. Nach Schließen der Spritze wurde diese mit 2 ml Tyrode befüllt, ohne den Filter zu beschädigen und auf ein 15 ml Falcon (Fisher Science, USA), welches als Auffangbehälter diente, gesteckt. Der Hahn wurde anschließend geöffnet und für exakt eine Minute wurde das Filtrat aufgefangen. Nach einer

Minute wurde die Spritze verschlossen und der in der Spritze verbliebene Rest verworfen. Abbildung 3.5 zeigt den verwendeten Filter mit zeitlichem Ablauf der Filterschritte.



**Abbildung 3.5: Durchführung Filtration.** In A wurde das Zellulosegemisch mit 2 ml Tyrode vermischt und gut geschüttelt, danach wurde der 3-Wege-Hahn geöffnet und die Tyrode abgelassen. B zeigt den Zellulosefilter, welcher mit 2 ml des verdünnten Plasmas überschichtet wurde. Nach Filtration des Plasmas wurden vorsichtig 500 µl der Erythrozytensuspension auf den Filter gebracht, welche innerhalb einer Minute in den Filter einzog (C). In D wurde nach Einziehen der Blutsuspension 2 ml Tyrode in die Spritze gefüllt und der 3-Wege-Hahn für genau 1 min geöffnet. Das hierbei filtrierte Blut wurde in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen und für den photometrischen Vergleich mit der unfiltrierten Probe benutzt.

### 3.6.4 Bestimmung der Filtrierbarkeit der Erythrozyten

Um die Filtrierbarkeit des Blutes objektiv beurteilen zu können, macht man sich die Tatsache zu nutze, dass das Verhältnis von Hämoglobingehalt pro definiertem Volumen Blut mit der Erythrozytenzahl nahezu parallel verläuft (Schlecht H. 1952). Somit kann man von der photometrisch bestimmten Hämoglobinkonzentration des Filtrates unter Einbeziehung der Hämoglobinkonzentration vor Filtration Rückschlüsse auf den relativen Anteil an Erythrozyten schließen, welche in einem definierten Volumen innerhalb von einer Minute filtrierte wurden.

Dazu wurden 200 µl jedes Filtrates pipettiert um jeweils ein gleiches Volumen zu erhalten. Anschließend wurden die Proben mit 500 µl Tyrode verdünnt, um jeweils ein Gesamtvolumen von 700 µl zu erhalten, welches benötigt wurde um jede Probe später in mindestens drei Küvetten unabhängig voneinander photometrisch zu messen und somit ggf. Messfehler zu erkennen. Die Problematik bei der photometrischen Bestimmung von Hämoglobin besteht darin, dass die Absorption des roten Blutfarbstoffes vom Oxiginierungszustand, pH-Wert sowie von nicht am Sauerstoffaustausch beteiligten Formen wie dem Methämoglobin oder dem CO-Hämoglobin abhängig ist. Alle diese Formen kommen zu einem bestimmten Anteil physiologisch im menschlichem Blut vor und machen eine exakte photometrische Hämoglobinbestimmung aus nativem Vollblut unmöglich (Meyer J. et al. 1956). Hinzu kommt das keiner der Formen stabil ist, sondern vielmehr eine ständige Transformation entweder spontan oder enzymatisch stattfindet. Daher muss zur exakten

photometrischen Bestimmung des Hämoglobinwertes eine Methode angewandt werden, welche den gesamten Blutfarbstoff in eine stabile Form mit definiertem photometrischem Absorptionsspektrum umwandelt.

### 3.6.5 Photometrische Bestimmung des Hämoglobinwertes mittels Hämiglobincyanid-Methode

Hämiglobincyanid ist das Transformationsprodukt, welches in einer zweistufigen chemischen Reaktion aus Hämoglobin, Oxyhämoglobin, Carboxyhämoglobin oder Methämoglobin gebildet werden kann. Es ist über Wochen stabil und weist nach Abschluss der chemischen Reaktion photometrisch ein Absorptionsmaximum bei 546 nm auf (Gressner A.M. 2013). Entscheidend hierbei ist ausschließlich die Änderung der Häm-Gruppe zu Hämincyanid. Abbildung 3.6 zeigt die zweistufige Reaktion von Häm zu Hämincyanid. David L. Drabkin beschrieb 1935 erstmals eine Transfusionslösung die dazu geeignet war Hämoglobin in stabiles Hämiglobincyanid umzuwandeln. 4 ml der Drabkinschen Lösung wurden mit 20 µl Blut in ein 5 ml Eppendorf Tube® (Eppendorf, DE) gegeben, gut vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem mischen wurden 2 ml dieser Lösung in eine Küvette (Sarstedt, DE) gegeben und die Extinktion photometrisch bei 546 nm gegen eine Referenz aus 1,99 ml Drabkinscher Lösung mit 10 µl Tyrode bestimmt. Bei den filtrierten Blutproben wurden je 200 µl mit 4 ml Drabkinscher Lösung inkubiert. Die Hämoglobinkonzentration wurde anschließend nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt und um einen Verdünnungskoeffizient ergänzt. Die relative Hämoglobin-Konzentration ergibt sich aus dem Verhältnis der photometrisch bestimmten und errechneten Konzentration vor Filtration zu der Konzentration nach Filtration.

Lambert-Beersches Gesetz:

$$c = \left( \frac{E}{\epsilon * d} \right) * a$$

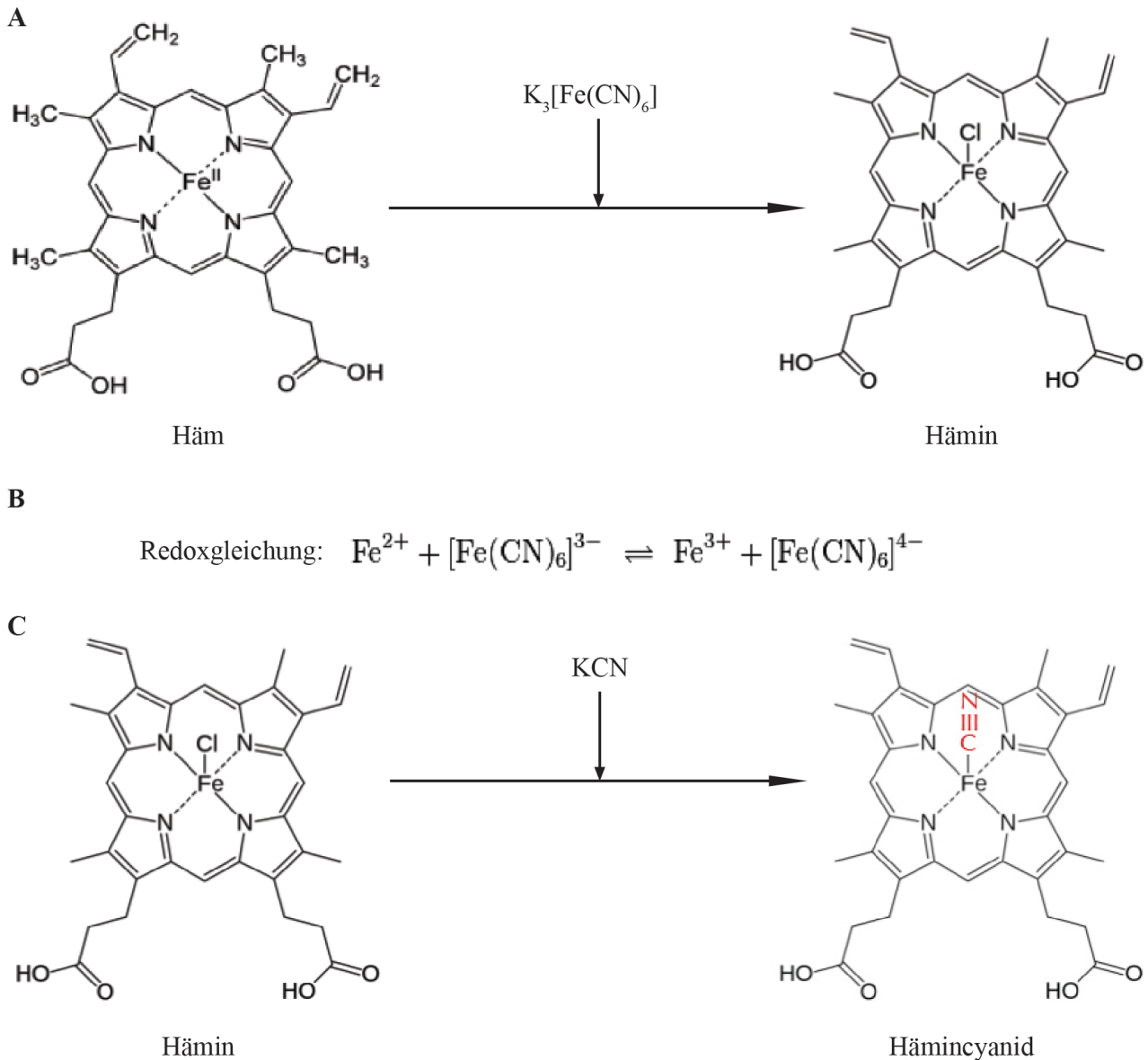
E : Extinktion der Lösung

ε : Extinktionskoeffizient

c : Konzentration des lichtabsorbierenden gelösten Stoffes

d : Schichtdicke der Küvette

a : Verdünnungskoeffizient



**Abbildung 3.6: Chemischer Umwandlungsprozess von Häm zu Hämincyanid.** A zeigt die Strukturformel des Häm. Das zweiwertige Eisen-Ion im Häm wird durch die Reaktion mit Kalium-Hexacyanoferrat-III ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) zu Hämin oxidiert (Pfeil). B zeigt die Redoxgleichung in welcher das zweiwertig-positive Eisen-Ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) zu einem dreiwertig-positivem Eisen-Ion ( $\text{Fe}^{3+}$ ) oxidiert wird. C stellt den zweiten Reaktionsschritt da. An der, durch die Oxidation des Eisen-Ions entstandene axiale, Bindungsstelle des Eisen-Ions bindet ein Chlorid-Ion ( $\text{Cl}^-$ ). Dieses wird durch die Reaktion des Hämins mit Kaliumcyanid ( $\text{KCN}$ ) durch Cyanid verdrängt (Pfeil). Es entsteht Hämincyanid mit einer axialen Cyanidbindungsstelle am zentralen Eisen-Ion (rot markiertes Cyanid). Hämincyanid kann keinen Sauerstoff aufnehmen, ist über Wochen stabil und hat ein spezifisches photometrisches Absorptionsmaximum bei 546 nm.

(Strukturformeln und Redoxgleichung entnommen und verändert von Quelle:

[http://www.unisaarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/GrundPraktikum\\_Bioinf/V7\\_huettermann\\_skript\\_2006.pdf](http://www.unisaarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/GrundPraktikum_Bioinf/V7_huettermann_skript_2006.pdf))

### **3.6.6 Filtration von Erythrozyten mit dem mechanosensitivem Kalziumkanalinhibitor GsMTx-4 sowie dem Gardos-Kanal Inhibitor TRAM-34**

Zur Beurteilung, ob die Filtrierbarkeit von Erythrozyten abhängig vom Vorhandensein mechanosensitiver Kalziumkanäle ist, wurden diese mittels dem Inhibitor GsMTx-4 (almone labs, ISR) geblockt. Dazu wurden der unter 3.6.1 hergestellten Erythrozytensuspension 5  $\mu$ M GsMTx-4 zugegeben und die Filtration, wie unter 3.6.2 – 3.6.5 beschrieben durchgeführt, sowie die Hämoglobinkonzentration ermittelt. Analog dazu wurde eine zweite Versuchsreihe mit 10  $\mu$ M des Gardos-Kanal-Inhibitor TRAM-34 (Sigma-Aldrich, USA) durchgeführt. Der Gardos-Kanal ist ein Kaliumkanal, welcher sich über die Aktivierung durch Kalzium öffnet und über den Ausstrom von Kalium, sowie passiv Wasser, aus der Zelle das Zellvolumen reguliert (Maher A.D. et al. 2003).

In einer dritten Versuchsreihe, in welcher sowohl die mechanosensitiven Kalziumkanäle mit 5  $\mu$ M GsMTx-4, als auch die Gardos-Kanäle mit 10  $\mu$ M TRAM-34 gleichzeitig geblockt wurden, sollte zusätzlich Hinweise darauf geben, ob ein Zusammenhang zwischen den Kalziumkanälen und den Gardoskanälen bezüglich der Filtrierbarkeit bestehen könnte.

## **3.7 Kalziumsignalmessung bei humanen Spender und Versuchstieren in Abhängigkeit von Prostaglandin E<sub>2</sub> und Erythropoetin**

### **3.7.1 Tierversuch im Rahmen einer anzeigepflichtigen Maßnahme**

Die Entnahme von Kleinstmengen Blut, sowie die Haltung der Wildtyp und verschiedenen TRPC-Knock-Out Mäusen unterliegt lediglich der Anzeigepflicht und benötigt daher keiner Genehmigung von Seiten des Landesamtes für Verbraucherschutz nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes. Die Anzeige liegt dem Amt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz vor, und wurde am 31.07.2009 unter dem Aktenzeichen H1-2.4.3.5 bestätigt. Als Versuchstiere dienten ausschließlich Tiere der Tierart Hausmaus (*Mus musculus*), wobei je Versuchsgruppe (siehe auch Tab. 3) 3 Tiere zur Verfügung standen.

### **3.7.2 Gewinnung und Anfärbung von humanen und tierischen Erythrozyten**

Die Gewinnung von 5  $\mu$ l Spenderblut erfolgte analog zum unter Punkt 3.2.3.1 beschriebenen Versuchsaufbau aus der Fingerbeere eines gesunden Spenders mit Verweis auf die informierte Einwilligung.

Den Versuchstieren wurden ebenfalls 5  $\mu$ l Kapillarblut, durch Punktion der Vena facialis entnommen. Dabei wurde die Maus mittels Zwangsgriff fixiert und die Vene mit einer Einmallanzette (Sarstedt, DE) punktiert. Blutstauung und Blutfluss wurden so stimuliert, dass ein Tropfen von 5  $\mu$ l direkt mit der Pipette aufgefangen und in 1 ml Tyrode verdünnt werden konnte.

Mit einem Wattetupfer wurde die Blutung sofort nach Entnahme gestillt und die Maus wurde für einige Minuten nachbeobachtet.

Das weitere Vorgehen, also Waschen, Färben und Handhabung, erfolgten analog zu Punkt 3.2.3.1.

### 3.7.3 Durchführung der Kalziumsignalmessung bei Stimulation mit Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Erythropoetin (EPO)

100 µl der zuvor angefertigten Erythrozytensuspension wurden für jede Versuchsgruppe mit 1 ml Tyrode verdünnt und in ein Deckglas gegeben. Bei Raumtemperatur wurden die Erythrozyten 15 min lichtgeschützt inkubiert, wobei diese absanken und den Farbstoff Flu-4AM deesterifizierten. Die Einstellungen der Zuflusskanüle und der Absaugung erfolgten analog zum in 3.3.1 beschriebenen Versuchsaufbau. Bereits 5 Minuten vor den Messungen wurde ein kontinuierlicher Zufluss, mit Tyrode, über die Kanüle eingestellt um Artefakte durch Einschalten der Zulaufkanüle erst bei Beginn des Versuchs zu vermeiden. Die erste Minute des Versuchs erfolgte analog mit der Perfusion isoosmolarer Tyrode. Nach einer Minute wurde das Schwerkraftperfusionssystem entsprechend der Versuchsgruppe, auf die Zufuhr von Tyrode + 5 nM EPO (Thermo Fisher Scientific, USA), Tyrode + 0,1 nM PGE<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, USA) oder Tyrode + 5 nM EPO + 0,1 nM PGE<sub>2</sub> umgestellt. Tabelle 3.8 zeigt die Versuchsgruppen und die jeweils durchgeführten Messungen.

Tabelle 3.8: Tabelle 3 zeigte die zur Durchführung der Kalziummessung verwendeten Versuchsgruppen sowie die Konstellationen der Stimulationen

Versuchsgruppe:	
Mensch	Jeweils durchgeführte Messungen:
Wildtyp Maus	1. Kontrolle mit Tyrode über gesamten Beobachtungszeitraum
TRPC 4/5 dKO - /- Maus	2. Erste Minute Tyrode, dann Tyrode + 5 nM EPO
	3. Erste Minute Tyrode, dann Tyrode + 0,1 nM PGE <sub>2</sub>
TRPC Hepta- Knock-Out (-/-) Maus	4. Erste Minute Tyrode, dann Tyrode + 5 nM EPO + 0,1 nM PGE <sub>2</sub>

### 3.8 Verwendete Software sowie Tests und Abbildungen zur statistischen Auswertung der Ergebnisse

Tabelle 3.9 zeigt die Namen und Funktionen der zur Auswertung der gezeigten Ergebnisse verwendeten Programme. Bei normalverteilten Werten wurde, wie allgemein üblich, als grafische Darstellung der Ergebnisse Mittelwerte sowie Balkendiagramme verwendet. Bei Werten die nicht der Normalverteilung folgen, wurde prinzipiell der Median bestimmt und analog zum Balkendiagramm die Darstellung als Boxplot gewählt. Tests auf signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen erfolgten für normalverteilte Populationen mittels t-Test. Nicht-normalverteilte Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test auf die Signifikanz ihrer Unterschiede getestet. Von einem signifikanten Unterschied wird ausgegangen, wenn ein p-Wert < 0,05 durch den jeweiligen Test errechnet wurde.

Tabelle 3.9: Namen, Entwickler und Funktionen der verwendeten Programme

Name	Funktion/Verwendung	Entwickler
VoxCellScan	Kamera, Konfokal und Beleuchtungs – Einstellungen am Mikroskop sowie Steuerung, Aufnahme und Wiedergabe der Konfokalmikroskop-Aufnahmen	VisiTech International, UK
Image J	Messung/Auswertung der Konfokalmikroskop Sequenzen mit Bestimmung von ROIs und Erstellung von Datenblöcken	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Igor Pro 6.2	Weiterverarbeitung, Berechnung der Rohdaten in $F/F_0$ -Ratios	WaveMetrics Inc., USA
PRISM 6	Statistik, Erstellen von Grafiken, Diagrammen und Tests	GraphPad Software Inc., USA
Adobe Illustrator CS6	Erstellung von Schemata, Grafiken, Bildbearbeitung	Adobe Systems, USA
Microsoft Office 2011	Datenverarbeitung, Tabellen, Formatierung, Erstellen der Dissertation	Microsoft Corporation, USA

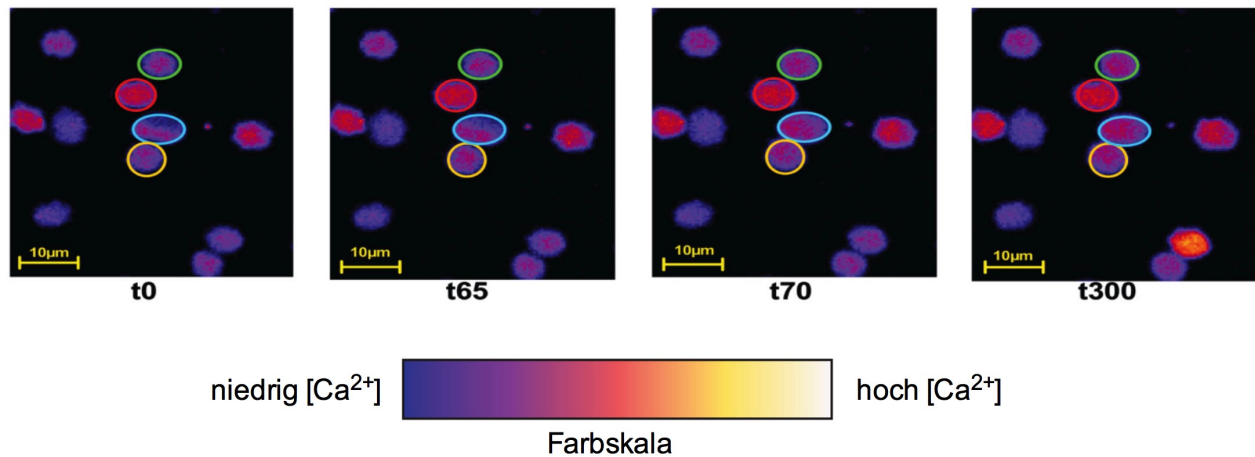


## 4. Ergebnisse

### 4.1 Kalziumsignalmessung bei mechanischer Stimulation und die Filtrierbarkeit von Erythrozyten

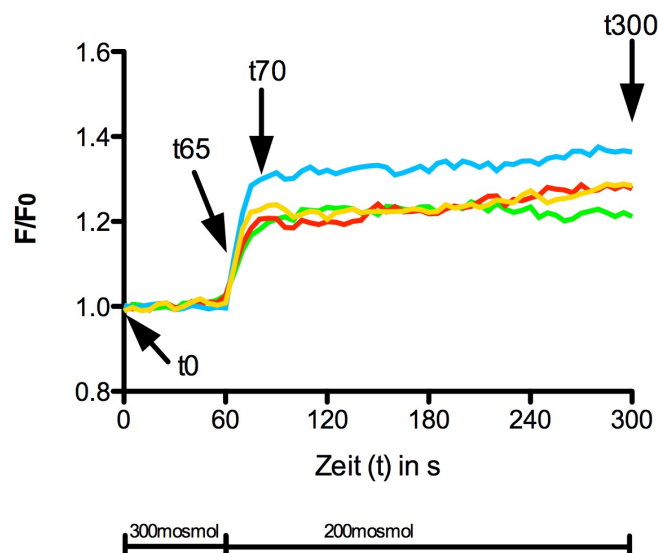
#### 4.1.1 Kalziumsignalmessung bei Änderung der Osmolarität

Zu Beginn soll der Einfluss eines mechanischen Reizes in Form einer generellen zellulären Schwellung, induziert durch Zugabe hypoosmolarer Tyrode, untersucht werden. Dazu wurde, wie im Methodenteil beschrieben, zum Zeitpunkt  $t = 60$  s mittels Schwerkraftperfusionssystem die isoosmolare Tyrode (300 mosm) durch hypoosmolare Tyrode ausgetauscht. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung der Zellen zeigt sich zum Zeitpunkt  $t = 0$  s, also bei Zufluss von isoosmolarer Tyrode, ein heterogenes Bild der beobachteten Erythrozyten (Abbildung 4.1). Die einzelnen Zellen zeigen untereinander deutliche Unterschiede in ihrer Grundfluoreszenz, eine zusätzliche Anreicherung bis zum Zeitpunkt  $t = 60$  s ist allerdings nicht zu beobachten (siehe auch Abbildung 4.2). Durch die hier angewendete Farbskalierung erscheinen Erythrozyten mit einem niedrigen basalen Kalziumniveau dunkelblau und werden mit steigendem freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  lila bis rot und schließlich weiß (siehe Abb.4.1; Farbskala). Für die folgende bildhafte Darstellungen der Änderung des freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals wurden beispielhaft 4 Zellen im Zentrum des Bildes markiert (rotes, blaues, gelbes und grünes Oval). Nach 60 s wurde die isoosmolare Tyrode über das Schwerkraftperfusionssystem durch eine hypoosmolare Tyrode mit 200 mosml ausgetauscht. Bild 2 in Abb. 4.1 zeigt hier eine Aufnahme zum Zeitpunkt  $t_{65} = 65$  s. Zu erkennen ist hier eine Zunahme der Fluoreszenz, also der freien Kalziumionen im Zytosol bei der blau und gelb umrandeten Zelle. Aufgrund der höheren Anfangsfluoreszenz ist in der rot und grün umrandeten Zelle noch kein großer Unterschied im Vergleich zu  $t_0$  zu erkennen. Ein signifikanter Anstieg der relativen freien Kalziumionenkonzentration ist allerdings bei allen markierten Zellen zu messen (siehe Abbildung 4.2). Über Zunahme oder Abnahme des Zellvolumens kann an dieser Stelle keine Aussage gemacht werden. Betrachtet man außerdem alle Erythrozyten auf der zweiten Aufnahme (Abb. 4.1,  $t_{65}$ ) kann man feststellen, dass es bei keiner der Zellen zu einer sichtbaren Abnahme der Kalziumionenkonzentration im Vergleich zur Anfangsfluoreszenz kommt. 10 Sekunden nach Umschalten des Schwerkraftperfusionssystems, also zum Zeitpunkt  $t = 70$  s haben die umrandeten Zellen den Punkt der maximalen Steigung bei der Fluoreszenzzunahme überwunden (siehe auch Abbildung 4.2). Vergleicht man diese Aufnahme mit den beiden vorherigen, sieht man eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz bei allen umrandeten Zellen. Die rot und grün umrandete Zelle zeigt nun auch eine sichtbare Zunahme im Vergleich zu den Voraufnahmen und auch die blau und gelb umrandeten Zellen nehmen im Vergleich zum Zeitpunkt  $t = 65$  s sichtbar an Signalstärke zu. Das letzte Bild der Aufnahmeserie zum Zeitpunkt  $t = 300$  s zeigt keine sichtbare Veränderungen der umrandeten Zellen zur vorangegangenen Aufnahme mehr. Das Fluoreszenzsignal bleibt über den gesamten Aufnahmezeitraum von 10 Sekunden nach Umschalten des Systems auf die hypoosmolare Tyrode nahezu konstant bzw. steigt in den einzelnen Zellen nur noch leicht (siehe auch Abb. 4.2). Die Zellen haben somit eine an die neue Situation angepasste Kalziumionenkonzentration angenommen, die deutlich über dem Niveau des Zeitpunktes  $t = 0$  s zu Versuchsbeginn liegt.



**Abbildung 4.1: Osmotische Stimulation von Erythrozyten.** Fluoreszenz-basierte Konfokalmikroskop-Aufnahme von Erythrozyten direkt nach abgeschlossener Inkubation mit 5  $\mu M$  Fluo-4 und 15 minütiger Absinkphase. Vier Zellen wurden hier beispielhaft farblich mit einer „Region von Interesse“ (ROI) markiert (grün, rot, blau und gelb) um im Verlauf Änderungen des freien intrazellulären  $Ca^{2+}$  besser darstellen zu können. Zum Zeitpunkt  $t = 60$  s wurde das System auf hypoosmolare Tyrode umgeschaltet. Somit zeigt das zweite Bild ( $t_{65}$ ) die erste Aufnahme, nach Änderung der Osmolarität. Aufnahme 3 ( $t_{70}$ ) zeigt die Erythrozyten 10 Sekunden nach Umschalten des Schwerkraftperfusionssystems von 300 mosmol auf 200 mosmol. Alle umrandeten Zellen zeigen hier im Vergleich zu den Voraufnahmen ( $t_0$  und  $t_{65}$ ) eine deutlich sichtbare Zunahme der Fluoreszenz und somit der intrazellulären freien Kalziumionenkonzentration. Die Aufnahme zum Ende der Beobachtungszeit ( $t_{300}$ ) zeigt im Vergleich zu Bild 3 keine mit bloßem Auge erkennbare Zunahme des Fluoreszenzsignals mehr. Auch messbar bleibt das Signal weitestgehend konstant über den gesamten Aufnahmezeitraum von  $t = 70$  s bis  $t = 300$  s. Die Farbskala unter dem Bild gibt farbliche Kodierung wieder, wobei blaue Werte eine niedrige Fluoreszenz und somit eine niedrige intrazelluläre Kalziumionenkonzentration wiedergeben und mit steigender Konzentration der Farbgradient über rot zu gelb und letztlich nach weiß wechselt.

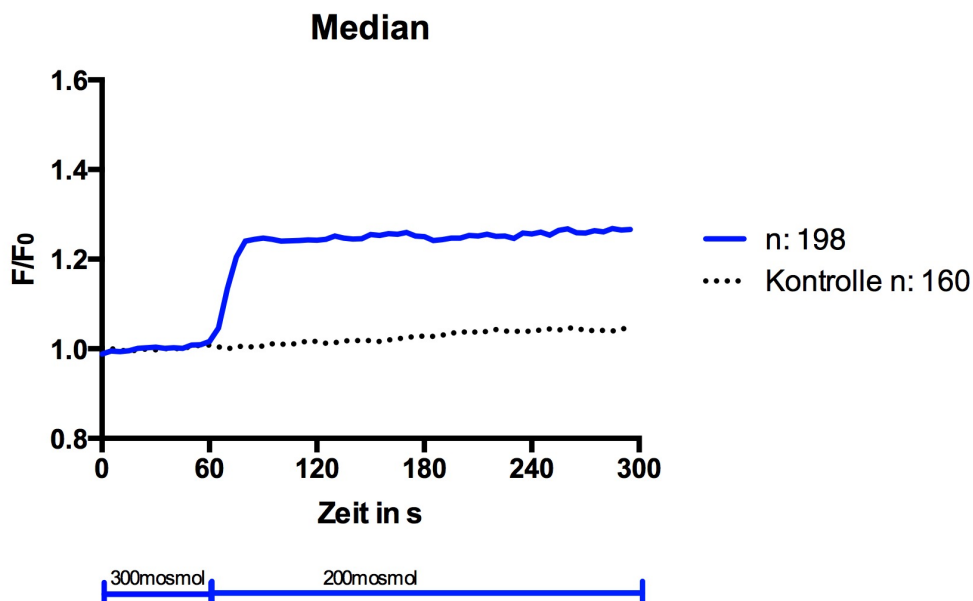
Abbildung 4.2 zeigt die zu Abbildung 4.1 korrelierten Einzelzell-Traces. Zu erkennen ist hier bei allen gezeigten Zellen ein deutlicher Anstieg der relativen Kalziumkonzentration  $F/F_0$  nach Umschalten des Systems von 300 mosmol auf 200 mosmol nach  $t = 60$  s. Die Steilheit des Anstiegs, welche mit einer schnellen Zunahme der freien intrazellulären Kalziumionen einhergeht, erreicht innerhalb weniger Sekunden ihr Maximum und fällt dann sehr rapide wieder gegen 0 ab. Bereits bei  $t = 70$  s, also 10 s nach Wechsel der Osmolarität hat sich das relative intrazelluläre Kalziumniveau auf einer höheren Stufe eingependelt und bleibt ab da während der gesamten Beobachtungszeit bis zum Ende des Versuchs bei  $t = 300$  s relativ konstant.



**Abbildung 4.2: Einzelzellmessung der relativen Kalziumionenkonzentration bei osmotischer Stimulation.**

Grafische Darstellung der relativen Kalziumionenkonzentration  $F/F_0$  in Abhängigkeit der Zeit  $t$  (s) zu den in Abbildung 4.1 gezeigten Einzelzellen. Die Farbe der einzelnen Graphen entspricht der farblichen Markierung der entsprechenden Zelle. Die Messungen starteten zum Zeitpunkt  $t_0 = 0$  s. Da es sich um relative Darstellungen der Kalziumkonzentration handelt, wurde  $t_0$  bei allen Zellen als Referenz durch den Wert von  $F_0$  geteilt um somit normierte relative Werte zu erhalten (schwarzer Pfeil  $t_0$ ). Bis zum Zeitpunkt  $t = 60$  s lag die Osmolarität der zufließenden Tyrode bei 300 mosmol. Im Intervall von 0 bis 60 s besteht zwischen den Einzelgraphen der Zellen kein Unterschied und es ist keine relative Änderung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu erkennen. Ab  $t = 60$  s ändert sich die Osmolarität des Zuflusses von 300 mosmol zu 200 mosmol. Die relative Kalziumionenkonzentration steigt bei allen Zellen sprunghaft zwischen  $t = 60$  s und  $t = 70$  s an. Ab Zeitpunkt  $t = 70$  s fällt die Steilheit der Steigung ab und somit bleibt die relative  $Ca^{2+}$ -Konzentration bis zum Beobachtungsende bei Zeitpunkt  $t = 300$  s auf einem höheren Niveau konstant. Anzumerken ist, dass sich die Graphen der Einzelzellen nach Stimulation heterogener verteilen als zuvor. Die blau markierte Zelle in Abb. 4.1 und somit der blaue Graph weist eine höhere relative Kalziumionenkonzentrationszunahme auf als die anderen markierten Zellen. Die schwarzen Pfeile ( $t_0$ ,  $t_{65}$ ,  $t_{70}$  und  $t_{300}$ ) markieren in der Grafik jene Punkte, zu welchen die Aufnahmen zu Abbildung 4.1 gemacht wurden.

Diese exemplarisch veranschaulichten Ergebnisse sind auch bei der Gesamtpopulation der beobachteten Zellen zu finden. Abbildung 4.3 zeigt die Verlaufskurve für die relative Kalziumionenkonzentration aller beobachteten Erythrozyten im Median. Hier zeigt sich analog zur Darstellung der Einzelzellen in Abbildung 4.2 eine sekundenschnelle Zunahme der relativen intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Zum Zeitpunkt  $t = 60$  s liegt der  $F/F_0$  - Wert bei 1,016. Bereits 5 s nach Umschalten des Systems von 300 mosmol auf 200 mosmol, also zum Zeitpunkt  $t = 65$  s liegt der Wert schon bei  $F/F_0 = 1,046$  und steigt weiter rasant an bis zum Zeitpunkt  $t = 80$  s mit einem  $F/F_0$  von 1,240. Die Mediankurve erreicht ihr Maximum zum Zeitpunkt  $t = 285$  s und einem  $F/F_0 = 1,268$ . Zur Kontrolle wurde zu jeder Messung eine zweite Gruppe aufgenommen und ausgewertet bei der sich die Osmolarität der Tyrode über die gesamte Versuchsdauer nicht ändert (Abb. 4.3 schwarz-gepunktete Kurve). Hier ist zu beobachten, dass sich der Median der Kalziumionenkonzentration über den Beobachtungszeitraum kaum ändert. Damit ist die Osmolarität (bzw. der osmotische Druck) die Variable, die am ehesten als Auslöser für den rapiden Kalziumioneneinstrom in der blauen Kurve in Frage kommt. Vergleicht man die Mediane der blauen stimulierten Kurve mit der Kontrolle, ergibt sich ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,001$  im t-Test für nicht-parametrische Verteilungen (Mann-Whitney Test).

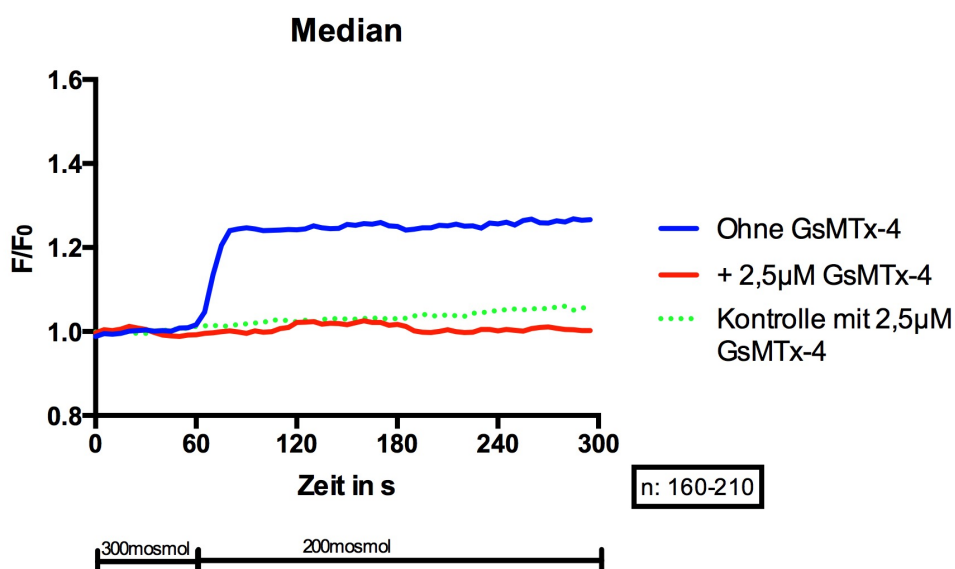


**Abbildung 4.3: Unterschied osmotische Stimulation zu Kontrolle.** Grafische Darstellung der relativen Kalziumionenkonzentration  $F/F_0$  in Abhängigkeit zur Zeit  $t$  (s). Gezeigt ist eine Verlaufskurve des Median aller beobachteten Zellen  $n = 198$  Zellen (blaue Kurve). Der blaue Verlaufsbalken zeigt die Osmolarität des Zuflusses an Tyrode zum entsprechenden Zeitpunkt an. Nach 60 s ändert sich die Osmolarität von 300 mosmol zu 200 mosmol und bleibt konstant bis zum Ende der Beobachtungszeit nach 5 min. Bei der Kontrollgruppe wurde die Osmolarität der Tyrode nach 60 s nicht geändert, es erfolgte also ein Zufluss von 300 mosmol über die Gesamtzeit von 5 min (schwarz-gepunktete Kurve). Zur detaillierten Beschreibung der Kurve sowie der Ergebnisse siehe Text.

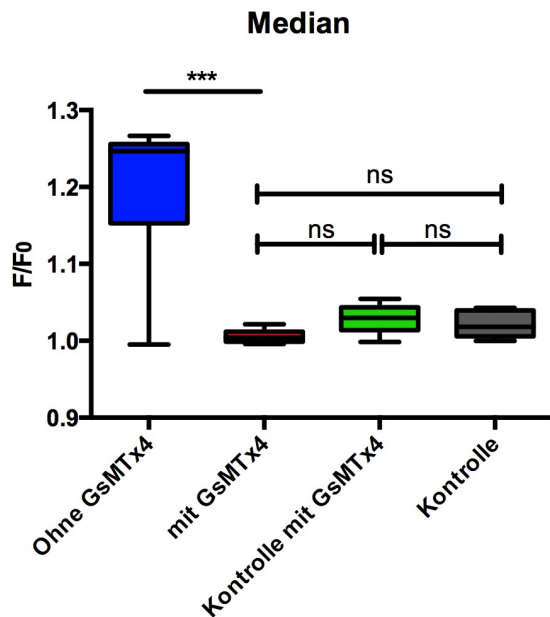
#### 4.1.2 Kalziumsignale bei Änderung der Osmolarität in Anwesenheit von GsMTx-4

GsMTx-4 ist ein Inhibitor für mechanosensitive Kalziumionenkanäle. Durch die Zugabe von  $2,5 \mu\text{M}$  GsMTx-4 blieb der unter 4.1.1 beschriebene Anstieg der  $F/F_0$ -Ratio aus. Abbildung 4.4 A-C zeigt die Mediane und die Maxima für die bereits in Abb. 4.3 dargestellten Verlaufskurven mit Ergänzung der Versuche, in welchen GsMTx-4 verwendet wurde. Dabei wurde analog zu den Versuchen ohne GsMTx-4 eine Gruppe mit Änderung der Osmolarität von 300 mosmol zu 200 mosmol zum Zeitpunkt  $t = 60$  s, sowie eine Kontrollgruppe ohne Änderung der Osmolarität, ausgewertet. Die Verlaufskurve der mit GsMTx-4 inhibierten Zellen zeigt bei einer Änderungen der Osmolaritäten keinen vergleichbaren plötzlichen Anstieg der relativen Kalziumionenkonzentration, sowie es bei den unbehandelten Zellen der Fall war (Abb. 4.4 A). In ihrer Gesamtheit sind die Mediane der mit  $2,5 \mu\text{M}$  GsMTx-4 inhibierte Zellen nicht signifikant verschieden zur Kontrolle. Betrachtet man auch Abbildung 4.3 B und C sieht man, dass sowohl die Mediane als auch die Maxima keine signifikante Änderung zwischen GsMTx-4 inhibierte Zellen und Kontrollen aufweisen. Sehr wohl zeigen allerdings alle drei Versuchsgruppen (GsMTx-4 inhibierte Zellen, Kontrolle ohne GsMTx-4, Kontrolle mit GsMTx-4) einen signifikanten Unterschied zur Versuchsgruppe der osmotisch stimulierten Zellen ohne GsMTx-4 ( $p < 0,001$ ). Es zeigt sich also zusammenfassend, dass es durch Änderungen der Osmolarität zu einem relativem Anstieg der freien intrazellulären Kalziumionen in gesunden menschlichen Spendererythrozyten kommt und dieser Anstieg durch GsMTx-4 inhibiert werden kann.

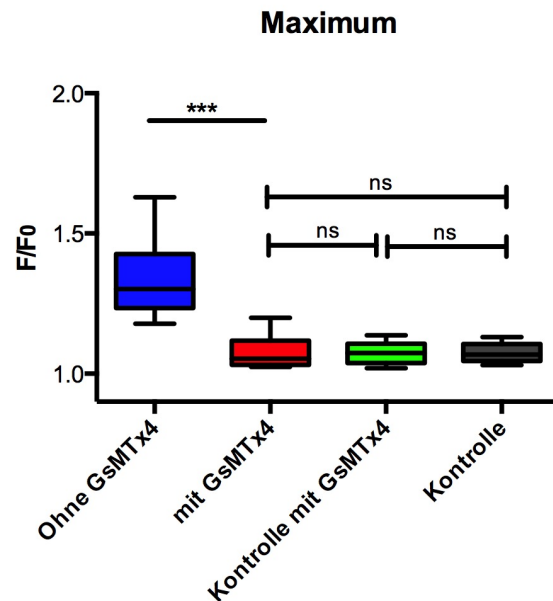
A



B



C



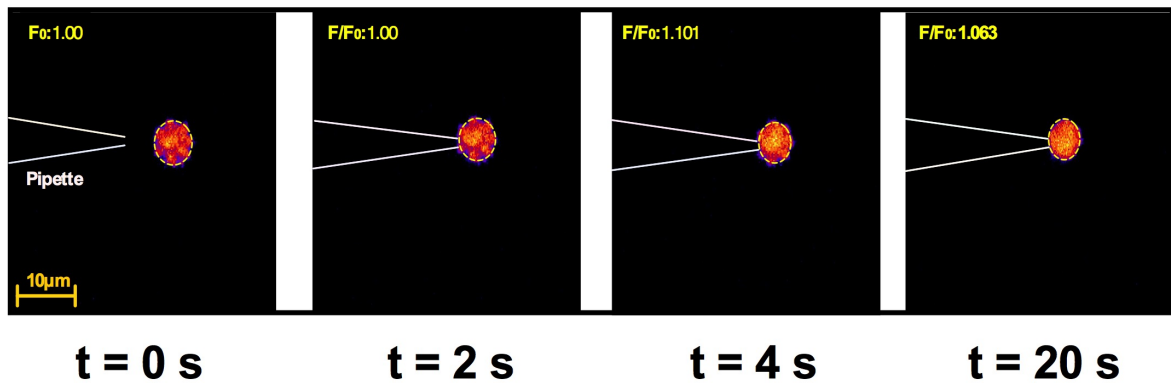
**Abbildung 4.4: Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration bei Änderungen der Osmolarität unter Einfluss von GsMTx-4.** A zeigt die grafische Darstellung der relativen Kalziumionenkonzentration  $F/F_0$  in Abhängigkeit zur Zeit  $t$  (s). Die blaue Verlaufskurve zeigt den Median aller gemessenen Zellen analog zu Abb. 4.3. Die rote Kurve zeigt den Median der mit  $2,5 \mu\text{M}$  GsMTx-4 stimulierten Zellen. Der schwarze Balken unter der Zeitachse zeigt die Osmolarität der Tyrode zum entsprechenden Zeitpunkt. Die grün-gepunktete Kurve zeigt den Median der Kontrollgruppe, welche ebenfalls mit  $2,5 \mu\text{M}$  GsMTx-4 inkubiert wurde, allerdings nicht durch Änderung der Osmolarität stimuliert wurde. Für sie gilt über die gesamte Versuchsdauer von 5 min ein Zufluss von Tyrode mit 300 mosmol. B zeigt die entsprechenden Mediane als Boxplot. Der Prozentbereich der Whiskers umfasst Werte zwischen der 5. und 95. Perzentile, die Boxen haben als untere Grenze das 1. und als obere Grenze das 3. Quantil. Die Farbe der Boxen entspricht den Kurven in Abb. 4.3 und 4.4 A. Die blaue Box, also die durch Änderung der Osmolarität stimulierten Zellen ohne GsMTx-4 weisen eine signifikant höhere relative Kalziumionenkonzentration auf als die mit GsMTx-4 behandelten Zellen oder die Kontrollen. Die Kontrollen (mit und ohne GsMTx-4) sowie die mit GsMTx-4 inkubierten und osmotisch stimulierten Zellen weisen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf. Das selbe gilt für die Maxima der einzelnen Versuchsgruppen und ist nochmal separat in Abb. 4.4 C dargestellt.

#### 4.1.3 Kalziumsignale bei direktem mechanischem Druck

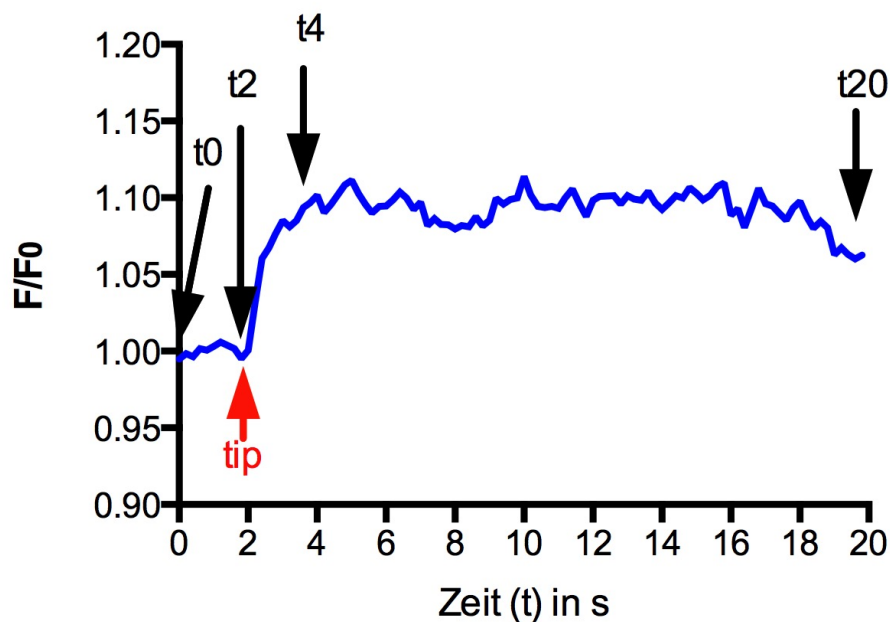
Um die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Teil besser zu verstehen, habe ich Erythrozyten direkt mit einer Mikropipette mechanisch gereizt und beobachtet wie es sich mit der relativen Kalziumionenkonzentration in den Zellen verhält. Dazu wurde eine Glaspipette, welche mit Tyrode gefüllt wurde um ein Ansaugen der Zelle zu vermeiden, an einzelne Erythrozyten herangeführt und die Zellmembran lokal leicht eingedrückt. Abbildung 4.5 A zeigt beispielhaft einzelne Aufnahmen aus einer Videosequenz. Dabei wurde der Zeitpunkt zu Beginn der Aufnahme ( $t = 0$  s) als Ausgangswert  $F_0$  gewählt und alle darauffolgenden Aufnahme als relative Änderung der freien Kalziumionenkonzentration im Erythrozyten berechnet. Die Pipette hat zum Zeitpunkt  $t = 0$  s noch keinen Kontakt zur Zelle. Erst ab Zeitpunkt  $t = 2$  s berührt die Pipette die Zelle und verbleibt in dieser Position bis zum Ende

der Beobachtungszeit  $t = 20$  s. Die Aufnahmegeschwindigkeit beträgt 5 Bilder/s. Bereits 2 Sekunden nach Berühren der Membran, also zum Zeitpunkt  $t = 4$  s ist ein deutlicher Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sichtbar und messbar. Zum Ende des Beobachtungszeitraums bei  $t = 20$  s sinkt die relative Kalziumionenkonzentration wieder, bleibt aber mit  $F/F_0 = 1,063$  noch über dem Ausgangswert von  $F/F_0 = 1$ . Betrachtet man die Verlaufskurve der Beispielzelle, sieht man nach Berühren der Zellmembran einen sprunghaften Anstieg der Kalziumionenkonzentration, die bis zum Ende auf einem höheren Level als der Ausgangswert bleibt (Abb. 4.5 B).

A



B

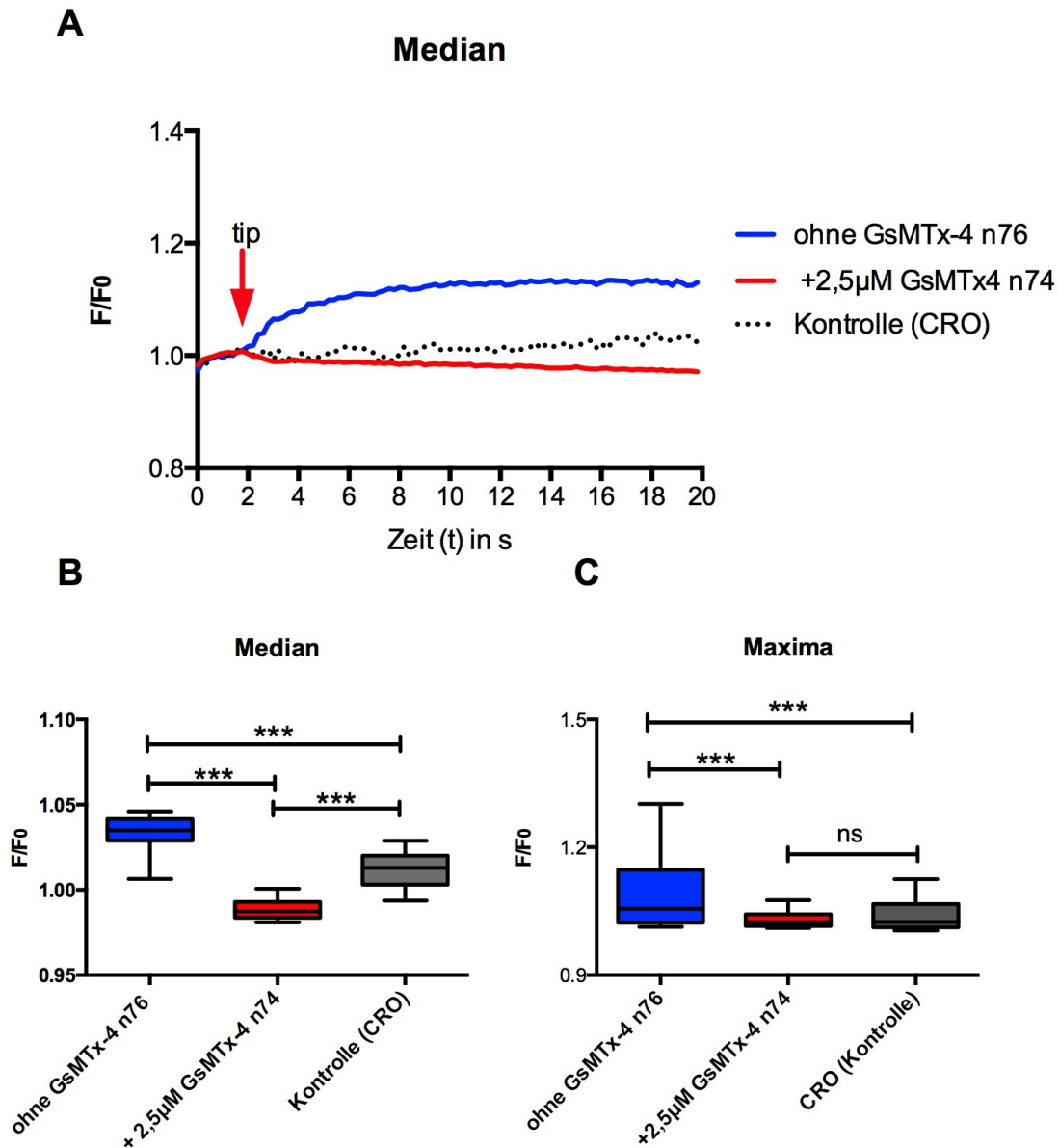


**Abbildung 4.5: Einzelzellmessung bei direktem mechanischem Reiz.** A zeigt Ausschnitte aus einer Fluoreszenz-basierten Konfokalmikroskop-Aufnahme eines Erythrozyten. Der Erythrozyt wurde markiert (gelbes Oval) und die relative Kalziumionenkonzentration durch den Fluoreszenzlevel innerhalb der Markierung bestimmt. Da die Pipette im Fluoreszenzmodus nicht sichtbar ist, wurde die Position der Pipette nachträglich

durch zwei weiße Linien dargestellt. Die vier Einzelbilder wurden entsprechend ihrem Aufnahmezeitpunkt beschriftet.  $t = 0$  s zeigt die Position der Pipette und die Fluoreszenz der Zelle zur Beginn der Aufnahme. Bei  $t = 2$  s berührt die Pipette die Zelle und bereits bei  $t = 4$  s ist eine deutliche Zunahme der relativen Kalziumionenkonzentration sichtbar.  $t = 20$  s zeigt die Zelle am Ende des Beobachtungszeitraums. Die Pipette hat ab  $t = 2$  s bis zum Ende konstant Kontakt zur Zelle. B zeigt die grafische Darstellung der Verlaufskurve des gezeigten Erythrozyten über die gesamte Versuchsdauer. Die schwarzen Pfeile zeigen die Zeitpunkte an denen die Einzelbilder aus A entnommen wurden. Der rote Pfeil mit der Beschriftung „tip“ zeigt den Zeitpunkt an dem die Pipette die Zelle berührt. Innerhalb von nur 2 Sekunden steigt durch diesen mechanischen Reiz die Kalziumionenkonzentration in der Zelle ausgehend von  $F/F_0 = 1$  zum Zeitpunkt  $t = 2$  s auf  $F/F_0 = 1,101$  zum Zeitpunkt  $t = 4$  s.

Betrachtet man im folgenden die Auswertung aller mechanisch stimulierten Zellen (Abbildung 4.6 A blaue Kurve, sowie B und C blaue Box) im Mittelwert sieht man eine deutliche Zunahme der relativen intrazellulären Kalziumionenkonzentration nach setzten des Reizes mit der Glaspipette nach den Zeitpunkt  $t = 2$  s. Nach einer schnellen Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den ersten Sekunden nach dem Reiz, verbleibt die Konzentration bis zum Ende der Versuchsdauer nach 20 s auf einem konstanten Level. Analog zu den vorangegangenen Ergebnissen konnte auch hier gezeigt werden das dieser schnelle Kalziumeinstrom durch die Inhibition mechanosensitiver Kationenkanäle mit GsMTx-4 zum erliegen kommt. (Abb. 4.6 A rote Kurve, sowie B und C rote Box). Zusätzlich konnten durch den intrazellulären Marker Calcein Red-Orange (CRO) Läsionen in der Zellmembran durch das direkte aufsetzen der Glaspipette ausgeschlossen werden, da der Fluoreszenzwert von CRO über die gesamte Beobachtungszeit konstant bleibt. Damit sollte zusätzlich sichergestellt werden, das es durch aufsetzen der Pipette zu keinen Verletzungen der Erythrozytenmembran gekommen ist, welche ebenfalls ursächlich für einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration sein könnten (Abb. 4.6 A schwarz-gepunktete Linie). Außerdem kann durch die Anfärbung mit CRO ein reiner Volumeneffekt als Ursache für die Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration ausgeschlossen werden. Die Zunahme der gemessenen Kalziumionenkonzentration bei gleichzeitig konstantem CRO-Level spricht hier ganz klar gegen artifizielle Kalziumsignalerhöhung durch Volumenabnahme in den Erythrozyten. Sowohl die Mediane als auch die Maxima der beiden gezeigten Versuchsgruppen zeigen einen signifikanten Unterschied in ihrer relativen Kalziumionenkonzentration (Abb. 4.6 B und C). Vergleicht man den Median der GsMTx-4 Gruppe mit dem der Kontrolle, zeigt sich ein signifikanter Unterscheid zwischen inhibierten Zellen und der Kontrolle. Dieser Unterschied begründet sich darauf, dass die Kalziumkonzentration der GsMTx-4 Gruppe im Verlauf leicht abnimmt. Dies bestätigt sich, wenn man wie in Abbildung 4.6 C die Maxima der beiden Gruppen vergleicht, da hier kein signifikanter Unterschied der beiden Boxen (rote und graue Box) zu sehen ist.

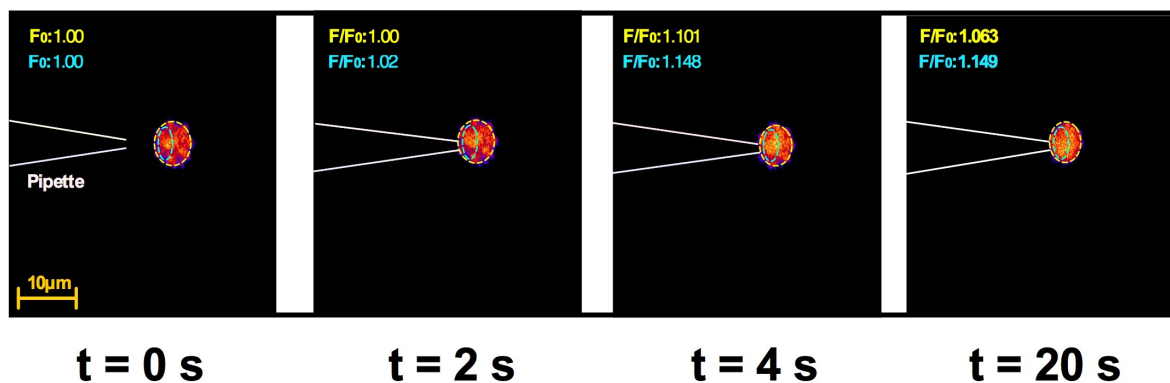




**Abbildung 4.6: Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration bei mechanischem Reiz unter Einfluss von GsMTx-4.** A zeigt die grafische Darstellung der relativen Kalziumionenkonzentration  $F/F_0$  in Abhängigkeit zur Zeit  $t$  (s). Die blaue Kurve zeigt den Mittelwert aus allen mechanisch stimulierten Zellen ohne GsMTx-4, die rote Kurve im Vergleich dazu die mit  $2,5 \mu\text{M}$  GsMTx-4 inkubierten Zellen. Zum Zeitpunkt  $t = 2$  s wurden bei allen Zellen ein mechanischer Reiz mittels Glaspipette gesetzt (roter Pfeil) und die Pipette verharrte am Ort der Reizung bis zum Ende der Beobachtungszeit nach 20 Sekunden. Die schwarz-gepunktete Linie zeigt den Mittelwert der relativen Calcein Red Orange Konzentration während der Versuchsdauer in den mechanisch gereizten Zellen. Der Wert ist über die gesamte Beobachtungszeit konstant. Somit konnten Membranläsionen durch die mechanische Reizung ausgeschlossen werden. B zeigt die Mediane der beiden Versuchsgruppen sowie die Kontrolle als Boxplot. Die relative Kalziumionenkonzentration der Gruppe ohne GsMTx-4 (blaue Box) ist signifikant ( $p < 0,001$ ) höher als die der Gruppe mit GsMTx-4 (rote Box). Der Median der GsMTx-4 Gruppe ist außerdem signifikant kleiner zur Kontrollgruppe. Dies begründet sich durch die Abnahme der Kalziumkonzentration während der Beobachtungszeit. Analog dazu zeigt C die Maxima der beiden Versuchsgruppen. Auch hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der relativen Kalziumionenkonzentration beider Gruppen ( $p < 0,001$ ). Betrachtet man hier die GsMTx-4 Gruppe und die Kontrolle, zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns = nicht signifikant).

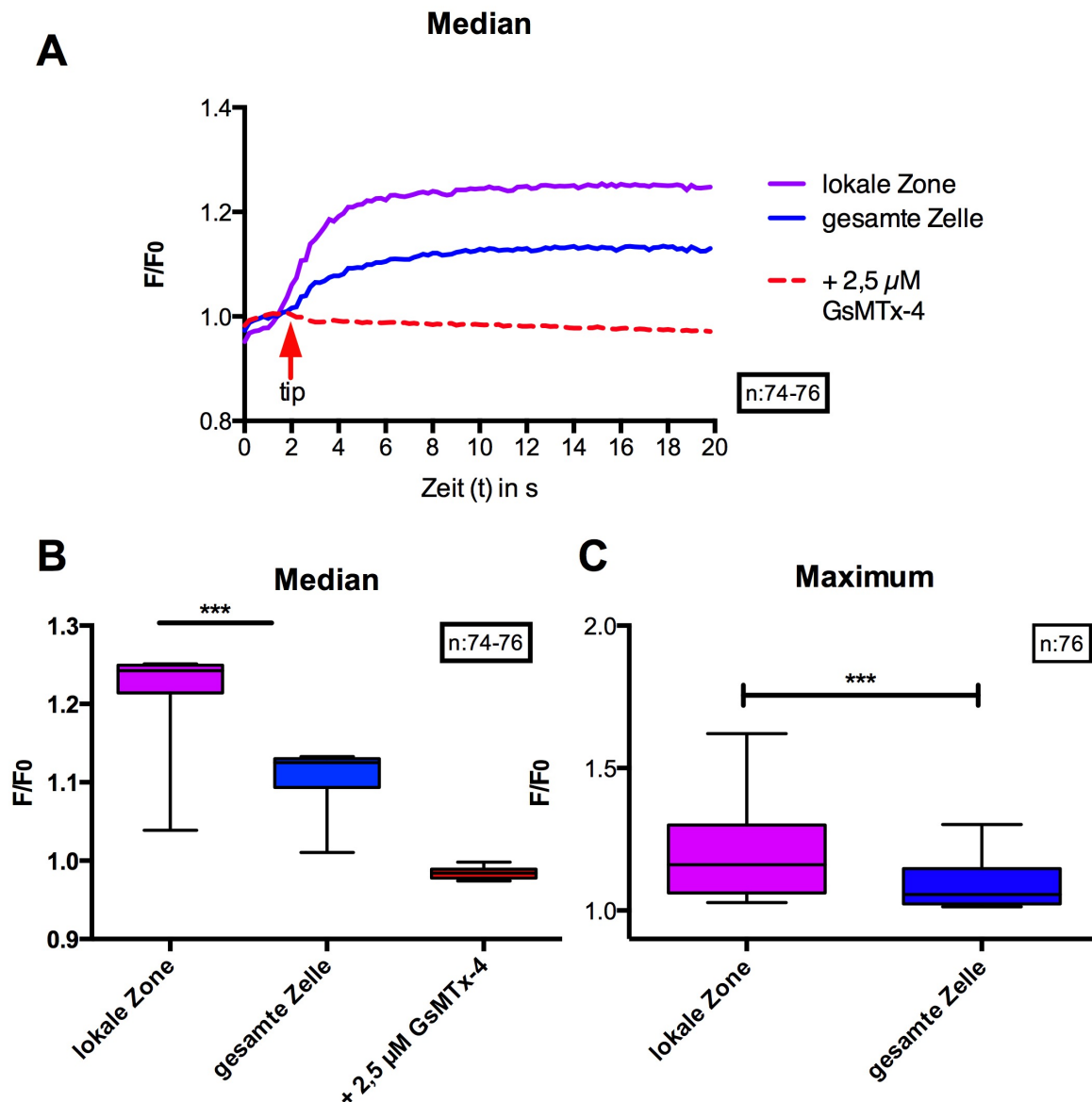


In der weiteren Auswertung der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die gemessene Zunahme der relativen Kalziumionenkonzentration lokal, im Bereich wo die Pipette die Zellmembran berührt höher als die durchschnittliche Kalziumkonzentrationszunahme der gesamten Zelle ist. Dazu wurde wie in Abbildung 4.7 beispielhaft gezeigt, neben der Auswertung der Fluoreszenz der gesamten Zelle (gelbe Markierung), eine zweites kleineres Markierungsfeld gewählt (blaue Markierung), welche den Bereich einkreist, an dem die Glaspipette an der Erythrozytenmembran ansetzt.



**Abbildung 4.7:** Ausschnitte aus einer Fluoreszenz-basierten Konfokalmikroskop-Aufnahme eines Erythrozyten. Neben der in Abb. 4.5 A bereits gezeigten  $F/F_0$ -Ratio der gesamten Zelle (gelber Kreis), wurde hier eine zweite „lokale“  $F/F_0$  -Ratio eingefügt (blauer Kreis) welche die relative Kalziumionenkonzentration in der Umgebung der mechanischen Reizung durch die Glaspipette darstellt. Die Position der Pipette wird schematisch durch die weißen Linien gezeigt. Die  $F/F_0$  - Werte der entsprechenden Kreise sind in der jeweiligen Farbe der Kreise auf die sie sich beziehen zu den gezeigten Zeitpunkten abgebildet.

Vergleicht man in der statistischen Auswertung die  $F/F_0$ -Ratio der gesamten Zelle mit den Werten für die lokale Fluoreszenz, zeigt sich sowohl für die Mediane als auch für die Maxima ein eindeutig signifikanter Unterschied der Kalziumkonzentrationszunahme (Abbildung 4.8). Diese Zunahme ist lokal signifikant höher als in der Gesamtheit der Zelle.



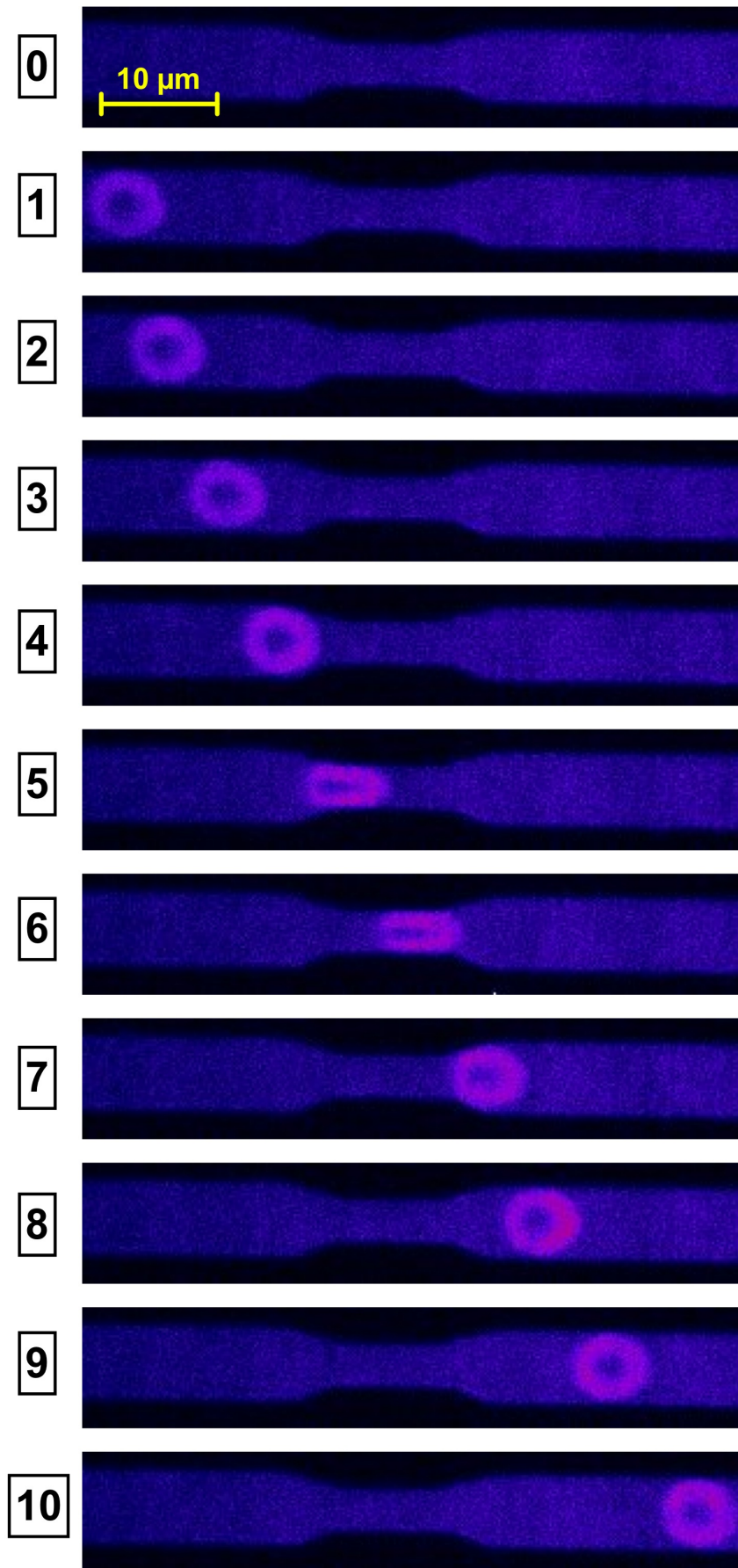
**Abbildung 4.8: Unterschiede in der Kalziumkonzentrationsverteilung bei mechanischem Reiz.** A zeigt analog zu Abb. 4.6 die Mittelwerte der  $F/F_0$ -Ratio in Abhängigkeit zur Zeit  $t$  in s, wobei die blaue Kurve die relative Kalziumkonzentration der mechanisch stimulierten Zellen zeigt. Die rot-gestrichelte Kurve zeigt die aus Abb. 4.6 übernommene relative Kalziumkonzentration der mechanisch stimulierten Zellen unter Einfluss von  $2,5 \mu\text{M}$  GsMTx-4. Die lila Kurve zeigt die relative Kalziumkonzentration der gleichen Zellen wie in der blauen Kurve. Hier wurde allerdings im Vergleich zur blauen Kurve nicht die gesamte Zelle markiert und gemessen, sondern nur der Bereich rund um die Pipettenspitze (hier als „lokale Zone“ bezeichnet). B zeigt Boxplots der in A gezeigten Versuchsgruppen. Zwischen allen 3 Gruppen besteht ein hoch-signifikanter Unterschied von jeweils  $p < 0,001$ . C zeigt analog dazu Boxplots der Maxima der lokalen Zone vs. der gesamten Zellmessung. Auch hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,001$ .

Die Ergebnisse zeigen also zusammenfassend, dass es durch direkten mechanischen Reiz eines Erythrozyten mit einer Glaspipette zu einem intrazellulären relativen Kalziumanstieg kommt. Dieser Effekt kann durch GsMTx-4 inhibiert werden. Die relative Kalziumkonzentration ist lokal um die mechanisch stimulierte Zone signifikant ausgeprägter, als in der gesamten Zelle. Durch zusätzliche Beladung der Zellen mit Calcein Red-Orange, einem zytosolischen Marker, konnte ein Membrandefekt bzw. ein

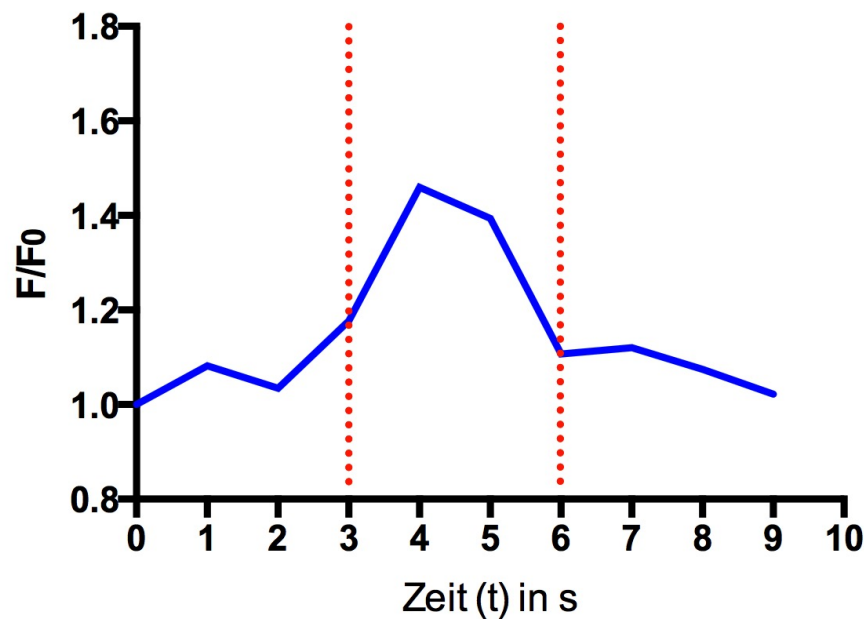
Volumeneffekt als Ursache für die Beobachtungen ausgeschlossen werden. Somit erhärtet sich die Hypothese, dass es auf Erythrozyten einen mechanosensitiven Kationenkanal geben muss, der zumindest in vitro und in der ruhenden Zelle einen Kalziumioneneinstrom vermittelt.

#### 4.1.4 Kalziumsignale im Kapillarmodell

Da die bisherigen Versuche nur Ergebnisse von ruhenden Erythrozyten zeigen, wurde für die weitere Untersuchung der mechanosensitiven Kationenkanäle auf Erythrozyten ein Kapillarmodell gewählt, welches es ermöglicht, einzelne Zellen bei der Passage von Engstellen, also in Bewegung zu beobachten. Abbildung 4.9 zeigt dabei beispielhaft eine der gemessenen Zellen als Bildsequenz aus der fluoreszenzbasierten Konfokalmikroskop-Aufnahme. Da sich der Hintergrund in den Aufnahmen aufgrund geringfügiger Hämolyse einzelner Zellen vor und während des Versuchs leicht mit anfärbte, sieht man neben der angefärbten Zelle auch die Konturen der Kapillare. Diese Hintergrundintensität musste allerdings zur statistischen Auswertung der Ergebnisse kompensiert werden, um die Messung der relativen Kalziumionenkonzentration in der Zelle nicht durch ein additives Hintergrundsignal zu verfälschen. Daher wurde jeweils das erste Bild, bevor die Zelle im Beobachtungsbereich war (Abbildung 4.9 Nr. 0) als Referenz für den Hintergrund genommen und zur statistischen Auswertung von den Bildern 1-10 abgezogen. Die in Abbildung 4.9 erkennbare Engstelle hat einen Durchmesser von 2  $\mu\text{m}$ . Die Geschwindigkeit des Erythrozyten betrug 5  $\mu\text{m/s}$ . Soweit im Fluoreszenzmodus an der Kalziumionenverteilung erkennbar, zeigt sich in Bild 1 eine typische Diskozytenform, die für eine besonders langsame Fließgeschwindigkeit und niedrige Druckverhältnisse im System spricht und somit sehr den physiologischen Gegebenheiten im menschlichen Kapillarsystem ähnelt. Durch Abnahme des Kapillardurchschnittes in Bild 6 und 7 (Abbildung 4.9) bei nahezu gleicher Fließgeschwindigkeit geht der Erythrozyt in die Fallschirmform über (siehe Einleitung Abbildung 1.7). Mit Eintritt in die Engstelle und bei Passage (Siehe Abb. 4.9 Bild 4 – 7) steigt außerdem sichtbar und messbar das Fluoreszenzsignal des Erythrozyten und somit die relative intrazelluläre Kalziumionenkonzentration. Nach Passage der Engstelle nimmt die Zelle wieder ihre Diskozytenform an und die relative Kalziumionenkonzentration sinkt wieder gegen den Ausgangswert  $F/F_0$ - Ratio = 1,022 bei Bild 10 (Siehe Abbildung 4.10)



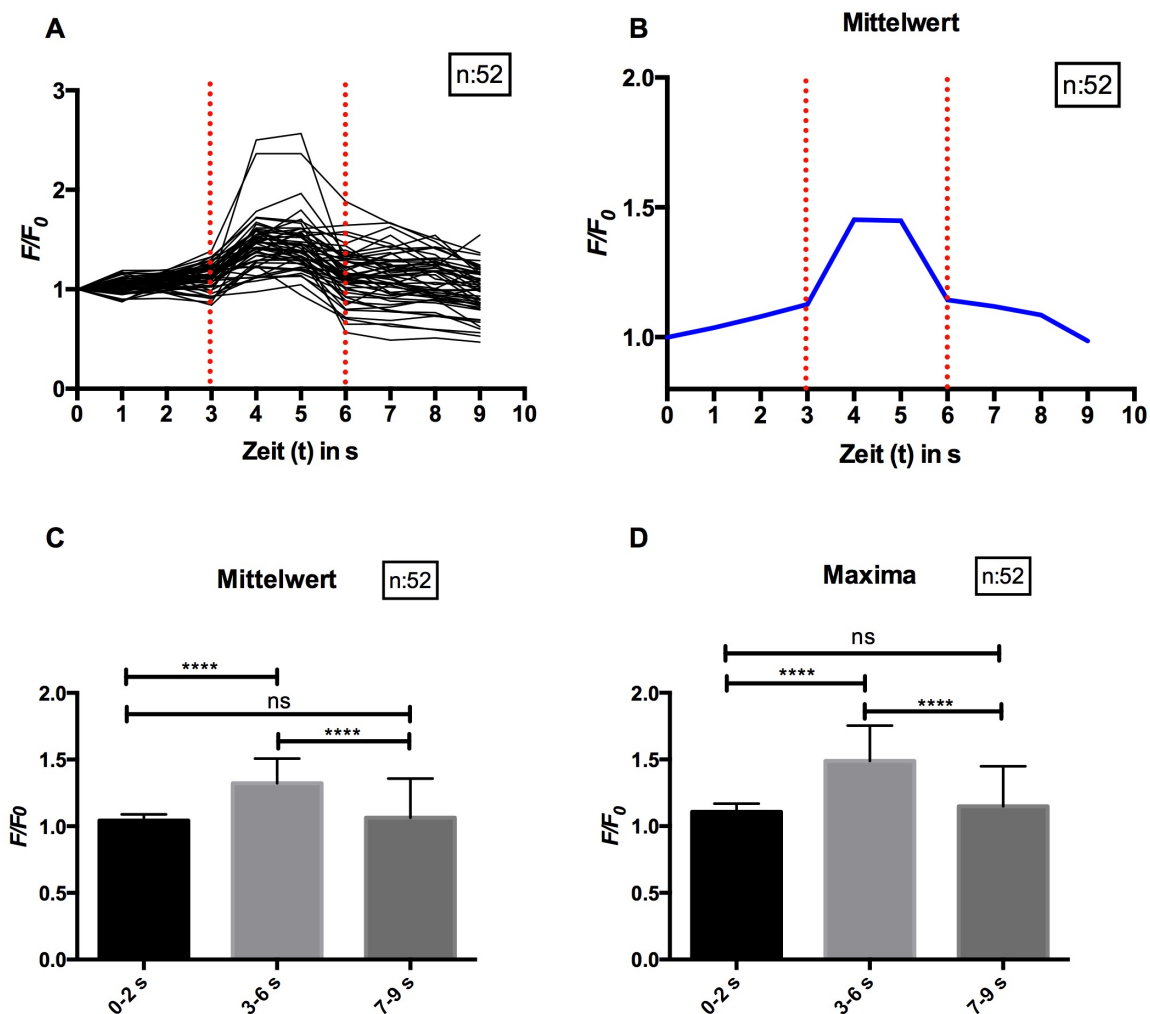
**Abbildung 4.9: Ausschnitte aus einer Fluoreszenz-basierten Konfokalmikroskop-Aufnahme eines Erythrozyten bei Passage durch eine Kapillare des MCD.** Die Bildsequenz ist zeitlich durchnummeriert wobei der Abstand zwischen zwei Bildern 1 Sekunde beträgt. Bild 0 wurde als Leeraufnahme für den Hintergrundabgleich für die Auswertung der darauf folgenden Bilder 1-10 gewertet (siehe Text). Bilder 1-4 zeigen die Annäherung der Zelle an die Engstelle. Bei Passage der Engstelle (Bild 5,6) zeigt sich eine sichtbare Zunahme des Fluoreszenzsignals, welche nach Passage der Zelle durch die Engstelle in Bild 9-10 wieder deutlich abnimmt. Außerdem lässt sich anhand der Änderung der Kalziumionenverteilung in der Zelle eine Änderung der Zellmorphologie von Diskozytenform in eine typische Fallschirmform vermuten. Der Durchmesser der Engstelle beträgt  $2\text{ }\mu\text{m}$ , die Länge beträgt  $10\text{ }\mu\text{m}$ . Vor und hinter der Engstelle weist die Kapillare einen Durchmesser von  $8\text{ }\mu\text{m}$  auf. Die Fließgeschwindigkeit beträgt  $5\text{ }\mu\text{m/s}$ , wobei 1 Bild/s Sekunde aufgenommen wurde. Die Belichtungszeit der einzelnen Bilder betrug 100 ms.



**Abbildung 4.10:** Grafische Darstellung der relativen Fluoreszenz  $F/F_0$  in Abhängigkeit der Zeit (t) in Sekunden. Zu sehen ist die Einzelzellmessung der zuvor in Abbildung 4.9 beispielhaft dargestellten Zelle, wobei Bild 1 hier dem Zeitpunkt  $t = 0\text{ s}$  entspricht. Das Zeitintervall zwischen 3 und 6 s (analog zu Abb. 4.9, Bilder 4-7) zeigt hier einen schnellen Anstieg des relativen Fluoreszenzsignals vor und während der Passage der Engstelle und einen schnellen Abfall des Signals nach Passage der Engstelle (durch rot-gestrichelte Linien markierter Bereich). Am Ende des Beobachtungszeitraum bei  $t = 9\text{ s}$  liegt die relative Fluoreszenz mit  $F/F_0 = 1,023$  wieder nahezu auf Höhe des Ausgangswertes. Die Hintergrundfluoreszenz aus Abbildung 4.9 wurde von den Messungen rausgerechnet. Dazu wurde die ursprüngliche  $F/F_0$  - Ratio der Zelle ermittelt und gegen den jeweiligen Hintergrund aus Abb. 4.9, Bild 0 verrechnet.

In der statistischen Auswertung aller detektierten Zellen zeigt sich analog zum zuvor beschriebenen Beispiel im Median ein ähnlicher Verlauf. Es wurden von 3 verschiedenen humanen Spender insgesamt 51 Zellen detektiert und ausgewertet. Abbildung 4.11 A zeigt die  $F/F_0$ -Ratio jeder einzelnen Zelle in Abhängigkeit der Zeit (t). Hier sieht man ein sehr heterogenes Verhalten der Zellen in Bezug auf die  $F/F_0$ -Ratio bei Passage durch die Engstelle. Es gibt einzelne Zellen, die bei Passage der Engstelle eine hohe Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration zeigen, aber auch welche, die ihre Kalziumkonzentration kaum steigern. Im Mittelwert zeigt sich jedoch, dass der überwiegende Teil der Zellen eine deutliche Zunahme der relativen intrazellulären Kalziumionenkonzentration aufweist (Abbildung 4.11 B). Auch zeigt sich hier im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Versuchen mit konstantem Stimulus eine Abnahme der relativen Kalziumionenkonzentration

nach Passage der Engstelle. Betrachtet man hier den Mittelwert der  $F/F_0$ -Ratio vor der Engstelle, während Passage der Engstelle und nach der Engstelle und stellt sie im t-Test (Normalverteilung) gegenüber, so zeigt sich eine deutlich signifikante Änderung der  $F/F_0$ -Ratio und somit der relativen intrazellulären Kalziumionenkonzentration während der Passage der Engstelle. Außerdem ist die relative Kalziumkonzentration vor und nach Passage der Engstelle nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 4.11 C). Analoge zum Mittelwert zeigt Abbildung 4.11 D die Maxima der  $F/F_0$ -Ratio vor, während und nach Passage der Engstelle. Auch hier zeigen sich signifikante Unterschiede der Kalziumionenkonzentration vor und während Passage der Engstelle, sowie kein signifikanter Unterschied der relativen Kalziumionenkonzentration vor und nach Passage der Engstelle.



**Abbildung 4.11: Kalziumionenkonzentration von Erythrozyten im Kapillarmodell.** A zeigt die einzelnen Graphen für jede gemessene Zelle (Anzahl  $n = 52$ ) die relative Änderung der Fluoreszenz  $F/F_0$  in Abhängigkeit der Zeit  $t$  in s. Die rot-gepunkteten Linien markieren dabei, das Zeitintervall in welchem die Zellen die Engstelle der Kapillare passiert haben. Besonders zu beachten sei hier die relative homogene Verteilungsbreite der Graphen vor Passage der Engstelle und das divergente Auseinanderstreben eben dieser bei Passage der Engstelle, sowie eine weitere Zunahme der Divergenz nach Passage (Analog zur gezeigten Standardabweichung in C und D). B zeigt den Mittelwert der in A gezeigten Einzelmessungen. Auch hier markieren die rot-gepunkteten Linien das Zeitintervall der Engstellenpassage. Zu erkennen ist hier eine leichte Zunahme der Fluoreszenz vor der Engstelle,  $F_0 = 1$  zum Zeitpunkt 0 s und  $F/F_0 = 1,07$  zum Zeitpunkt 2 s. Mit Annäherung und Passage der Engstelle steigt das Fluoreszenzsignal sprunghaft und erreicht sein Maximum bei  $F/F_0 = 1,45$  zum Zeitpunkt  $t = 4$  s. Bereits zum Ende der Engstelle nimmt das Signal ebenso sprunghaft wieder ab ( $F/F_0 = 1,14$

zum Zeitpunkt  $t = 6$  s) und erreicht am Ende der Messung mit  $F/F_0 = 0,99$  zum Zeitpunkt 9 s wieder nahezu den Ausgangswert  $F_0$ . C zeigt im Vergleich die Mittelwerte des Fluoreszenzsignals  $F/F_0$  im Balkendiagramm wobei im Zeitintervall 0-2 s der Median vor der Engstelle, im Zeitintervall 3-6 s der Median während Passage der Engstelle und im Zeitintervall 7-9 s der Median hinter der Engstelle gezeigt ist. Im Vergleich zeigt sich hier eine hoch-signifikante Änderung der Fluoreszenz während Passage der Engstelle im Vergleich zu den vorherigen und nachfolgenden Werten. Beim Vergleich der Mittelwerte vor vs. nach Passage der Engstelle konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. D zeigt analog zu C die Maxima der entsprechenden Zeitintervalle im Vergleich. Zu beachten sei auch hier die bereits angesprochene Zunahme der Divergenz und damit das heterogene Verhalten der Einzelzellen in Bezug auf die relative Änderung ihrer Fluoreszenz während und nach Passage der Engstelle, was sich hier deutlich in der Zunahme der Standardabweichung der einzelnen Balken zeigt. Alle Unterschiede wurden mittels t-Test auf ihre Signifikanz geprüft wobei vier Sterne (\*\*\*\*) einem p-Wert  $< 0,0001$  entsprechen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass es bei Erythrozyten, die eine Kapillare passieren und dabei auf eine Engstelle treffen, die kleiner als ihr physiologischer durchschnittlicher Durchmesser von  $7,5 \mu\text{m}$  ist, es zu einer signifikanten Zunahme der relativen intrazellulären Kalziumionenkonzentration kommt. Erstmals konnte in diesem nicht-statischem Versuch gezeigt werden, dass nach Beendigung des mechanischen Reizes die Kalziumionenkonzentration wieder auf Niveau des Ausgangswertes zurückfällt, was mit einer Inaktivierung bzw. Schließung Kalziumkanäle nach Beendigung des mechanischem Stimulus konform wäre. Durch den Abfall der Kalziumkonzentration nach Passage der Engstelle konnte außerdem nahezu ausgeschlossen werden, dass eine Membranschädigung und damit unkontrollierte Ein- und Ausstrom von Kalziumionen Auslöser für die gezeigten Ergebnisse ist. Auch das unterschiedliche Verhalten von Erythrozyten im Bezug auf die Zunahme der relativen Kalziumionenkonzentration bei Passage der Engstelle spricht für einen kanalvermittelten Kalziumioneneinstrom welchen entsprechend des Volumens und der Rigidität der Zellmembran variiert.

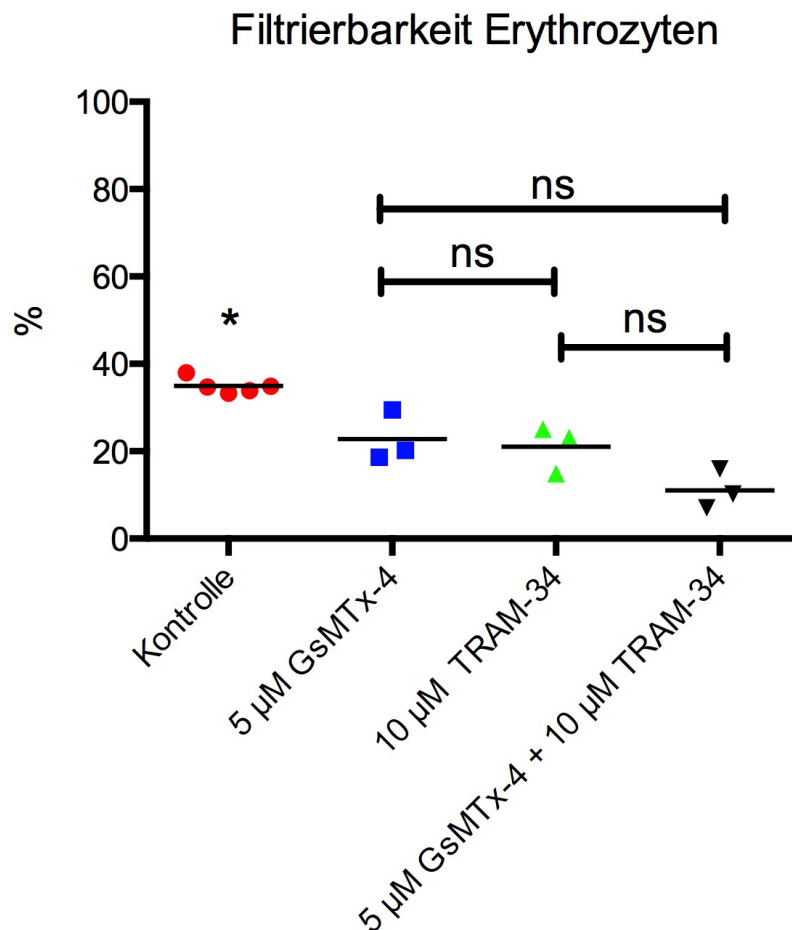
Durchgeführte Versuche mit GsMTx-4 inkubierten Erythrozyten, konnten nicht weiter ausgewertet werden, da es in absteigenden Konzentrationen von  $2,5 \mu\text{M}$  bis  $0,1 \mu\text{M}$  GsMTx-4 zu derartigen Obstruktion des Systems kam, dass keine verwertbaren Daten evaluiert werden konnten. Das System verstopfte, da die Zellen nicht mehr durch die Engstelle in der Kapillare passten und dadurch die parallelgeschalteten Kapillare derart verlegten, dass binnen kürzester Zeit (1-2 Minuten) ein Rückstau von Tyrode in die Einspritzkanüle zu beobachten war. Im Bereich der Engstellen kam es wegen des steigenden Drucks vermehrt zu Zelllyse und damit zur Freisetzung größerer Mengen an intrazellulärem Fluo-4, wodurch nicht mehr zwischen Zelle und extrazellulärem Milieu unterschieden werden konnte. Auch das Aufsuchen von Erythrozyten hinter der Engstelle im Weißlichtmodus zeigte keinen verwertbaren, vitalen Erythrozyten mehr.



## 4.2 Filtrierbarkeit von Erythrozyten

Die Filtrierbarkeit von Erythrozyten erlaubt Rückschlüsse auf die Rigidität und das Volumen dieser Zellen, besonders wenn man diese wie hier in einem strengen zeitlichen Aspekt beurteilt. Kleine und flexible Zellen passieren demnach schneller das Filtergeflecht als große und starre Zellen. Als objektives Maß der Filtrierbarkeit gilt hier der gemessene Hämoglobingehalt der Blutsuspension vor Filtrierung im Vergleich zum Hämoglobinwert nach 1 Minute Filtrierung, wobei dieses Verhältnis als prozentualer Anteil an Hämoglobin nach Filtrierung in Relation zum Ausgangswert dargestellt ist. Gemäß der Annahme, dass der Hämoglobingehalt in Erythrozyten beim gesunden Spender in jeder Zelle nahezu gleich ist (siehe Material und Methoden 3.6.4), kann damit indirekt auf den relativen Anteil an gefilterten Erythrozyten innerhalb 1 Minute geschlossen werden. Abbildung 4.12 zeigt die prozentuale Filtrierbarkeit der Erythrozyten aus verschiedenen Gruppen, wobei die Erythrozytensuspensionen jeweils von gesunden Spendern stammen. Bei der Kontrollgruppe wurden keine Kanalinhhibitoren zugesetzt. Der Median der Kontrollgruppe liegt bei 34,79% mit einer Standardabweichung von  $\pm 2,09\%$ . Bei der gesunden Kontrollgruppe wurden also in der ersten Minute 34,79% der Erythrozyten von der Ausgangssuspension filtriert. Die Filtrationsrate der Erythrozytensuspension mit 5  $\mu\text{M}$  GsMTx-4 als Inhibitor für mechanosensitive Kationenkanäle beträgt 20,23% mit einer Standardabweichung von  $\pm 5,86\%$ . Damit wird die Erythrozytensuspension mit GsMTx-4 signifikant schlechter filtriert als die Kontrollgruppe (p-Wert: 0,024). Bei Filtration der Erythrozytensuspension zusammen mit dem Gardos-Kanal Inhibitor TRAM-34 beträgt die Filtrationsrate 23,16% mit einer Standardabweichung von  $\pm 5,41\%$ . Auch hier zeigt sich eine signifikant niedrigere Rate als bei der Kontrollgruppe (p-Wert: 0,024). Zwischen der GsMTx-4 Gruppe und der TRAM-34 Gruppe konnte allerdings kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In der letzten Versuchsgruppe wurden sowohl GsMTx-4 als auch TRAM-34 zugefügt. Die Filtrationsrate wird hier mit 10,2% mit einer Standardabweichung von  $\pm 4,55\%$  am niedrigsten. Auch hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Wert: 0,024). Allerdings ist auch hier der Unterschied zu TRAM-34 Gruppe, sowie zur GsMTx-4 Gruppe nicht signifikant kleiner. Damit zeigt sich, dass Erythrozytensuspensionen, bei denen die mechanosensitiven Kationenkanäle inhibiert sind oder bei denen der Gardos-Kanal inhibiert ist, innerhalb der ersten Minute eines Filtrationsvorgangs schlechter filtrierbar sind, also ein signifikant kleinerer Anteil der Erythrozyten in dieser Zeiteinheit das Filtergeflecht passiert, als es unter Kontrollbedingungen der Fall ist.





**Abbildung 4.12: Darstellung der prozentualen Filtrierbarkeit der vier verschiedenen Versuchsgruppen.**

Zu jedem Spender wird jeweils ein Plot gezeigt und pro Versuchsgruppe wurde der Median der jeweiligen Plots ermittelt (schwarze Linien). Die Kontrollgruppe bestand aus  $n = 6$  Spendern (rote Kreise). Der Median hier beträgt 34,79% (SD  $\pm$  2,09%). Die anderen drei Gruppen (Erythrozytensuspension + 5  $\mu$ M GsMTx-4 = blaue Quadrate, Erythrozytensuspension + 10  $\mu$ M TRAM-34 = grüne Dreiecke und Erythrozytensuspension + 5  $\mu$ M GsMTx-4 und 10  $\mu$ M TRAM-34 = schwarze Dreiecke) bestanden aus jeweils  $n = 3$  Spendern. Die Gruppen wurden untereinander mittels Mann-Whitney-Test verglichen, wobei sich die Kontrollgruppe signifikant von den drei anderen Gruppen unterscheidet (\*). Die drei Gruppen mit GsMTx-4, TRAM-34 oder beiden Inhibitoren zeigen untereinander keinen signifikanten Unterschied (ns = nicht signifikant). Für die genauen Werte der Filtrationsrate im Median mit Standardabweichung, sowie der Ergebnisse des Mann-Whitney-Test, siehe Text.

### 4.3 Kalziumsignalmessung bei hormoneller Stimulation

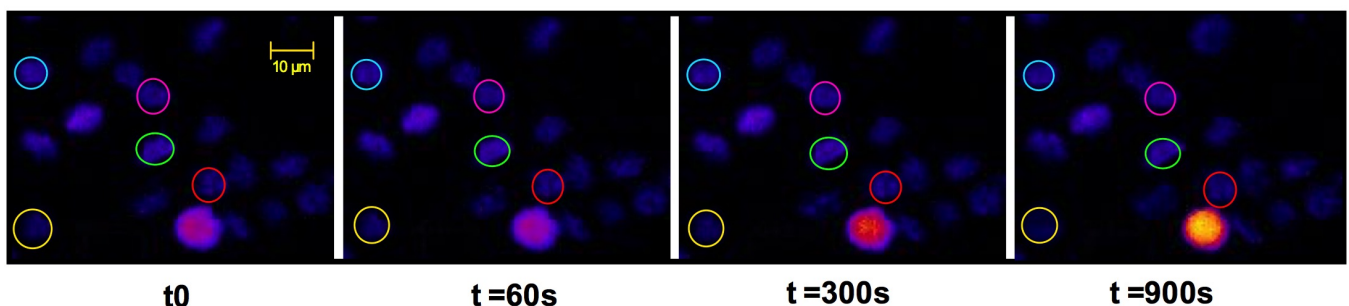
#### 4.3.1 Kalziumsignale in Erythrozyten humaner Spender und von Versuchstieren in Abhängigkeit von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Erythropoetin (EPO)

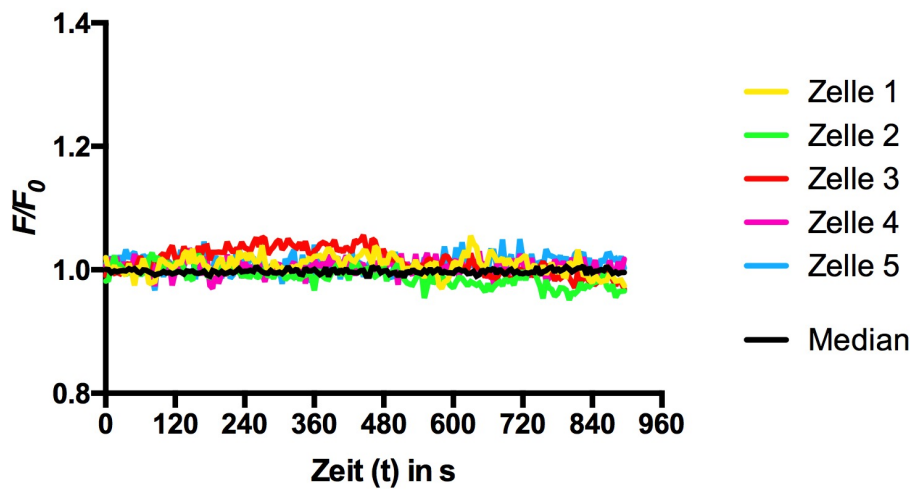
Es wurde Blut von 4 verschiedenen Versuchsgruppen, nämlich von gesunden menschlichen Spendern, Wildtyp Mäusen, Mäusen mit einem Knock-out der Gene für den TRPC 4 und TRPC 5 Kanal (TRPC 4/5 (-/-)), sowie Mäusen mit komplettem Knock-out der TRPC kodierenden Gene (TRPC Hepta-Knock-Out (-/-)). Jede Gruppe wurde wiederum in eine Kontrollgruppe und drei Versuchsgruppen unterteilt, wobei je eine Versuchsgruppe mit PGE<sub>2</sub>, EPO und EPO+PGE<sub>2</sub> stimuliert wurde. Aufgrund des sehr heterogenen Verhaltens der einzelnen Zellen in den Gruppen untereinander, wurden zur Auswertung der Ergebnisse die einzelnen Erythrozyten in „Responder“ und „Non-Responder“ unterteilt, wobei ein Responder als relativer intrazellulärer Kalziumionenanstieg über 3 Standardabweichungen über dem Median der Kontrollgruppe (ohne Stimulation) festgelegt wurde.

#### 4.3.2 Kalziumsignale bei humanen Spender in Abhängigkeit von PGE<sub>2</sub> und EPO

Die Kontrollgruppe der menschlichen Erythrozyten zeigt über die Versuchsdauer ein sehr homogenes und nahezu konstantes Bild, was die  $F/F_0$ -Ratio über den beobachteten Zeitraum von  $t = 900$  s angeht. Abbildung 4.13 A zeigt hierfür beispielhaft eine Bildsequenz aus den Zellen der Kontrollgruppe. Ein Vergleich verschiedener ausgewählter Einzelzellen (farblich umrandete Zellen in 4.13 A) mit dem Median aller Zellen in Abbildung 4.13 B zeigt einen nahezu gleichen Verlauf der markierten Zellen zum Median der gesamten Kontrollgruppe. Die statistische Auswertung der Einzelkurven gegen den Median der gesamten Kontrollgruppe zeigt keinen signifikanten Unterschied im Mann-Whitney-Test (Daten nicht gezeigt). In der Bildsequenz ist außerdem eine Zelle gezeigt (roter Pfeil), die in der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte  $F/F_0$ -Ratio zeigt, die bis zum Ende des Versuchs zunimmt. Der Anteil der Zellen, die in der Kontrollgruppe, also ohne Stimulation durch PGE<sub>2</sub> oder EPO, während der Versuchsdauer eine Erhöhung der  $F/F_0$ -Ratio größer 3 Standardabweichungen gegenüber dem Median aufweist und somit als „Responder ohne Stimulus“ bezeichnet wird, beträgt 4,4% (Siehe auch Abbildung 4.15).

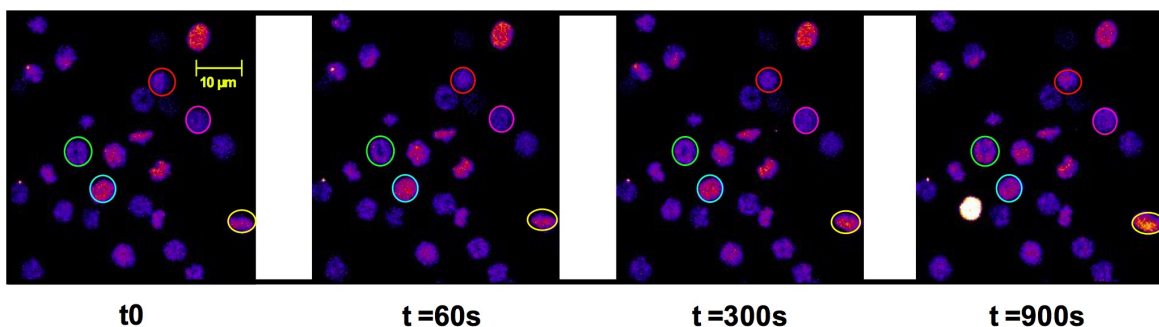
**A**

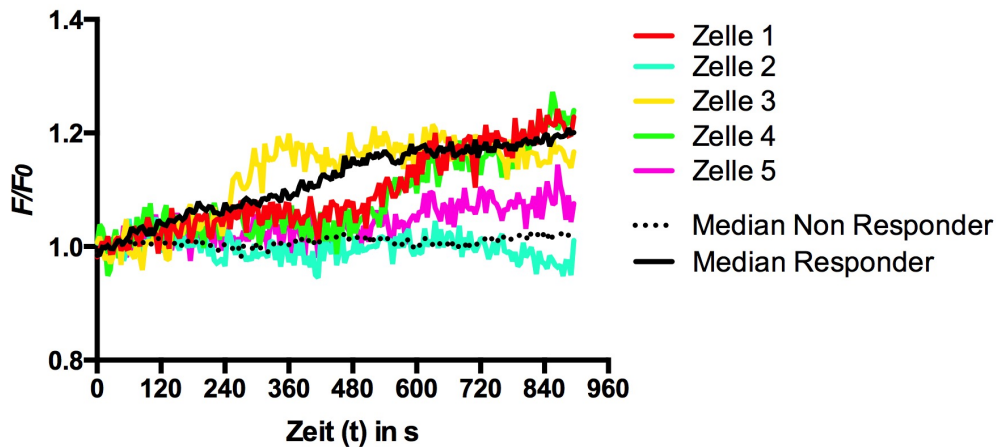


**B**

**Abbildung 4.13: Beispielhafte Darstellung von Erythrozyten der humanen Kontrollgruppe.** A zeigt eine Bildsequenz aus einer Fluoreszenzbasierte Konfokalmikroskopie-Aufnahme der humanen Kontrollgruppe. Die Bilder wurden jeweils zum Versuchsbeginn ( $t = 0$  s), nach 60 s, nach 300 s sowie zum Ende der Messung zum Zeitpunkt  $t = 900$  s aufgenommen. Die farblich markierten Zellen sind in der grafischen Darstellung der  $F/F_0$ -Ratio gegen die Zeit in Abbildung B gezeigt (Zellen 1-5). Die Farbe der jeweiligen Kurve entspricht der Farbe der Markierung. Die schwarze Kurve in B gibt den Median der gesamten Kontrollgruppe wieder. Die Aufnahmegeschwindigkeit beträgt 1 Bild/ 5 s.

Abbildung 4.14 zeigt analog zur Betrachtungsweise in Abbildung 4.13 eine Bildsequenz während der Stimulation von humanen Erythrozyten mit  $\text{PGE}_2$  und EPO. Dabei zeigt sich unter den markierten Zellen ein heterogenes Bild aus Zellen die während der Versuchsdauer ihre  $F/F_0$ -Ratio kaum ändern (blau markierte Zelle) und welchen, bei denen die  $F/F_0$ -Ratio deutlich über die 3 Standardabweichungen steigt und somit als Responder definiert werden (gelb markierte Zelle). Im Gesamtvergleich der Responder gegen die Non-Responder zeigt sich im Zeitintervall vor Stimulation ( $t_0$  bis  $t = 60$  s) kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen (Siehe auch 4.14 B Verlauf der schwarzen Responder-Kurve im Vergleich zur schwarz-gepunkteten Non-Responder-Kurve bis zum Zeitpunkt der Stimulation). Erst mit Beginn der Stimulation mit  $\text{PGE}_2$  und EPO ab Zeitpunkt  $t = 60$  s nimmt die Divergenz der beiden Kurven zu und erreicht ihr Maximum zum Ende der Messung hin. Der prozentuale Anteil der Zellen, die als Responder definiert werden, beträgt bei Stimulation von humanen Erythrozyten mit  $\text{PGE}_2$  und EPO 13,4% (siehe auch Abbildung 4.18).

**A**

**B**

**Abbildung 4.14: Beispielhafte Darstellung von humanen Erythrozyten nach  $\text{PGE}_2$  - Stimulation.** Analog zu Abb. 4.13 A ist hier unter A eine Bildsequenz aus einer Fluoreszenz-basierten Konfokalmikroskopie-Aufnahme der humanen Versuchsgruppe unter Stimulation der Zellen mit  $\text{PGE}_2$  zeigt.

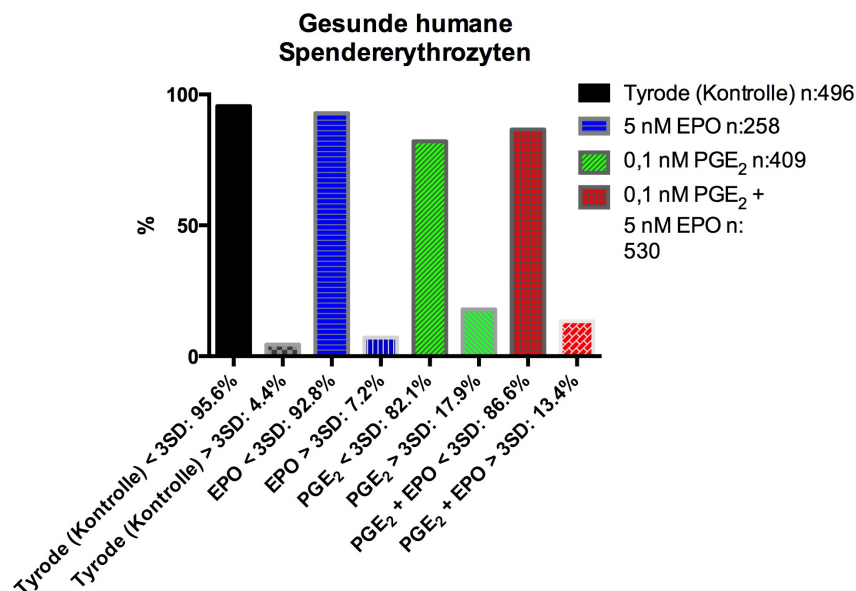
Die Bilder wurden jeweils zum Versuchsbeginn ( $t = 0$  s), nach 60 s, nach 300 s sowie zum Ende der Messung zum Zeitpunkt  $t = 900$  s aufgenommen, wobei ab Zeitpunkt  $t = 60$  s die Stimulation begann. Die farblich markierten Zellen sind unter B als Kurven für die  $F/F_0$ -Ratio in Abhängigkeit zur Zeit  $t$  in s abgebildet, wobei die Farbe der Markierung analog zur Farbe der Kurven ist. Zusätzlich wurde in B der Median aller Responder der Versuchsgruppe (schwarze Kurve), sowie der Median der Non-Responder der Versuchsgruppe (schwarzgepunktete Kurve) eingezeichnet. Dies soll verdeutlichen, dass die hier gezeigten Einzelkurven dem heterogenen Bild der gesamten Gruppe entspricht. Die Aufnahmegeschwindigkeit beträgt 1 Bild/ 5 s.

Die in Abbildung 4.13 und 4.14 gezeigten und beschriebenen Beispiele sollen hier exemplarisch der Veranschaulichung dienen und verdeutlichen, weshalb im folgenden zwischen Respondern und Non-Respondern unterschieden wird. Aus diesen Gründen, wird im weiteren Verlauf der Auswertung neben den Ergebnissen und Statistiken der verschiedenen Versuchsgruppen, sowohl die Einteilung in Responder und Non-Responder vorgenommen, sowie Aussagen zur prozentualen Verteilung dieser beiden Gruppen im Bezug auf die Gesamtpopulation getroffen. Dies dient dem Zweck im weiteren Verlauf auch Aussagen über die Effektstärke, also wie viele Zellen der Gesamtheit auf die oben genannten Stimuli mit einer adäquaten Änderung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration reagieren, gemacht werden. Abbildung 4.15 zeigt die prozentuale Verteilung der Responder und Non-Responder in den jeweiligen Versuchsgruppen der gesunden humanen Spendererythrozyten. Da in der Kontrollgruppe kein Stimulus gesetzt wird, sondern die Erythrozyten über die gesamte Versuchsdauer nur mit isoosmolarer Tyrode gespült werden, wäre hier für die 4,4% der Zellen die einen entsprechenden Kalziumanstieg zeigen der Begriff „Responder“ irreführend. Daher sollten diese als der Anteil an Zellen gesehen werden, die ohne einen der hier untersuchten Stimuli ihre relative intrazelluläre Kalziumionenkonzentration spontan ändern. Vergleicht man die Zahl dieser Zellen mit der Zahl der Responder in der mit EPO stimulierten Versuchsgruppe, welche prozentual 7,2% beträgt, ist der Unterschied an reagierenden Zellen nur gering (2,8% mehr Zellen reagieren mit mehr als 3 SD auf Stimulation mit EPO, als Zellen die nicht stimuliert werden). Bei Stimulation mit  $\text{PGE}_2$  liegt dieser Anteil bei 17,9% der gesamten Versuchsgruppe. Eine Doppelstimulation mit  $\text{PGE}_2$  und EPO lässt den Anteil 13,4% der Zellen, welche mit einem Kalziumionenanstieg von  $> 3\text{SD}$  reagieren sinken.

Betrachtet man die Kurven aller Mediane im zeitlichen Verlauf und in Abhängigkeit zur  $F/F_0$ -Ratio (Abb. 4.16 A), sieht man, dass sich die Kurve der  $PGE_2$ - Gruppe am deutlichsten von den anderen Gruppen abhebt (grüne Kurve). Die doppelstimulierte Gruppe ( $PGE_2 + EPO$ , rote Kurve) nimmt eine Zwischenposition, zwischen der  $PGE_2$  und der EPO- Gruppe ein. Die EPO-Gruppe überschneidet sich weitläufig mit der Kontrollgruppe (blaue und schwarze Kurve). Zum besseren Vergleich wurden in Abbildung 4.16 B die Responder der einzelnen Versuchsgruppen im Boxplot abgebildet und mittels Mann-Whitney-Test statistische Unterschiede ermittelt.

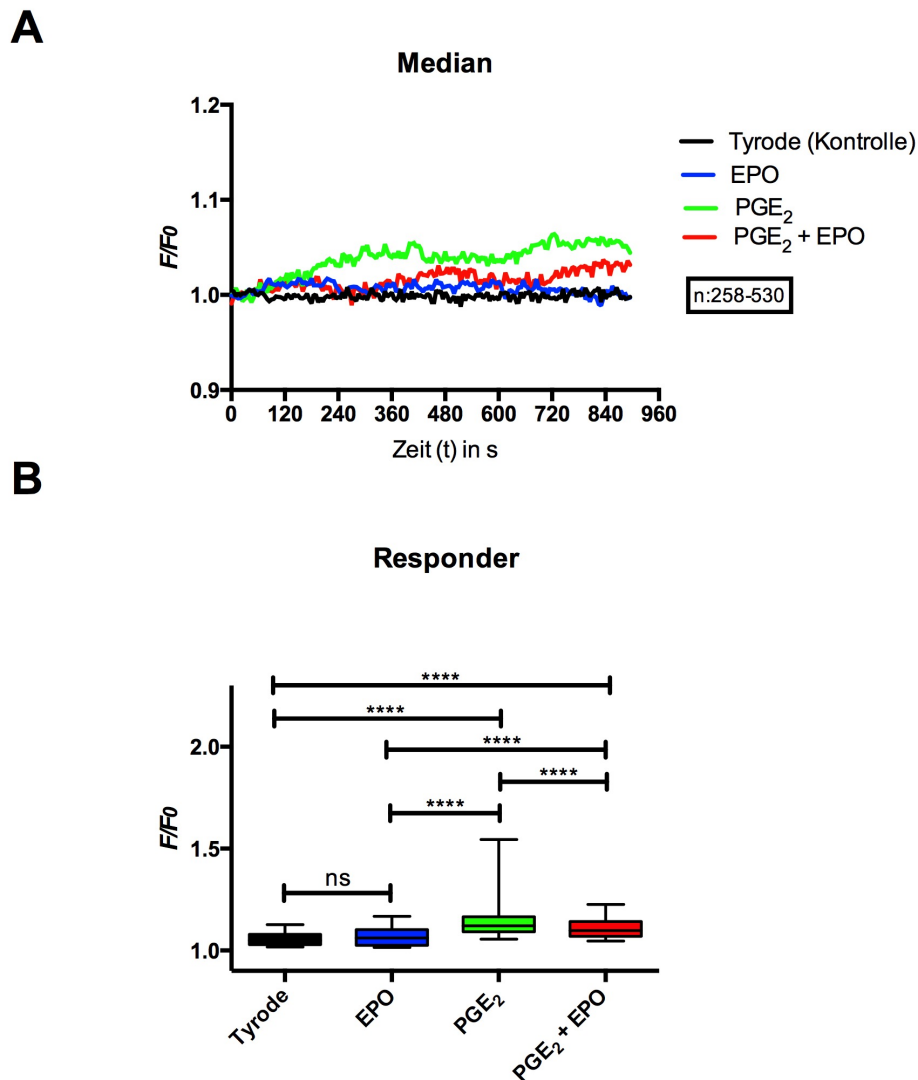
Vergleicht man die  $F/F_0$ -Ratio der Responder bzw. der Kontrollgruppe, die ohne Stimulation mit  $> 3SD$  reagiert, sieht man keinen signifikanten Unterschied der Kontrollgruppe mit der EPO-Gruppe. Die  $PGE_2$ -Gruppe zeigt den höchsten Median und ist zu allen anderen Gruppen signifikant unterschiedlich (p-Wert: 0,0001; siehe Abb. 16 B). Der Median der  $PGE_2 + EPO$ -Gruppe ist zwar signifikant niedriger als der Median der  $PGE_2$ -Gruppe, allerdings signifikant höher als der Median der EPO Gruppe und der Kontrollgruppe.

Betrachtet man also die Ergebnisse aus Abbildung 4.15 und 4.16 zusammen, sieht man, dass der prozentuale Anteil der Responder vom Stimulus abhängig ist und es bei alleiniger Stimulation mit  $PGE_2$  bei gesunden humanen Spendererythrozyten zum höchsten Anteil an Respondern kommt (17,9% der Versuchsgruppe sind Responder). Eine gesonderte Betrachtung der Responder untereinander zeigt zudem, dass auch die Höhe der  $F/F_0$ -Ratio vom Stimulus abhängig ist. Die alleinige Stimulation mit 0,1nM  $PGE_2$  zeigt im Median die höchste  $F/F_0$ -Ratio, gefolgt von der  $PGE_2 + EPO$  Gruppe. Eine alleinige Stimulation mit 5 nM EPO führt hingegen zu einem nur geringen Anteil von Respondern, welcher sich nicht signifikant von den Kontrollzellen, die eine  $F/F_0$ -Ratio  $> 3SD$  aufweisen unterscheidet.



**Abbildung 4.15: Prozentuale Verteilung der humanen Spendererythrozyten.** Balkendiagramm zur prozentualen Verteilung der Erythrozyten die im Beobachtungszeitraum einen relativen intrazellulären Kalziumanstieg von  $< 3 SD$  und  $> 3 SD$  aufwiesen. Die Farbe der Säulen entspricht dabei den in der Legende (rechts) gezeigten Versuchsgruppen. Die beiden schwarzen Balken zeigen die Kontrollgruppe. 4,4% der Erythrozyten weisen einen Anstieg der Kalziumionen um mehr als 3 SD auf. Die blauen Balken zeigen die Gruppe der mit 5 nM EPO stimulierten Zellen, wobei hier 7,2% mit einem Kalziumionenanstieg  $> 3SD$  reagierten. Bei der Stimulation mit 0,1 nM  $PGE_2$  sind es 17,9% adäquat reagierende Zellen (grüne Balken). Bei

einer Doppelstimulation mit 0,1 nM PGE<sub>2</sub> und 5 nM EPO reagieren 13,4% der Erythrozyten mit einem relativen intrazellulären Kalziumionenanstieg von > 3SD (roter Balken).



**Abbildung 4.16: Median und Responder der Versuchsgruppen bei humanen Spendererythrozyten.** A zeigt die Mediane der Kontrollgruppe (schwarze Kurve) und der Versuchsgruppen (grüne, blaue und rote Kurve) während der Beobachtungszeit (Zeit (t) in s) als  $F/F_0$ -Ratio. Die nebenstehende Legende symbolisiert welche Kurve für welche Versuchsgruppe steht. Die Anzahl der gemessenen Zellen in den Gruppen rechts im Kästchen mit n: 258-530 angegeben. B zeigt die Responder bzw. der Erythrozyten der Kontrollgruppe mit einer  $F/F_0$ -Ratio > 3 SD als Boxplots. Die Farben sind analog zu A gewählt. Die Linien darüber geben die Unterschiede der einzelnen Gruppen mit entsprechender Signifikanz an, wobei vier Sternchen (\*\*\*\*) einem p-Wert < 0,0001 entsprechen. Die  $F/F_0$ -Ratio der EPO-Responder (blauer Balken) und der Kontrollgruppe mit  $F/F_0$ -Ratio > 3 SD ist nicht signifikant unterschiedlich (ns).

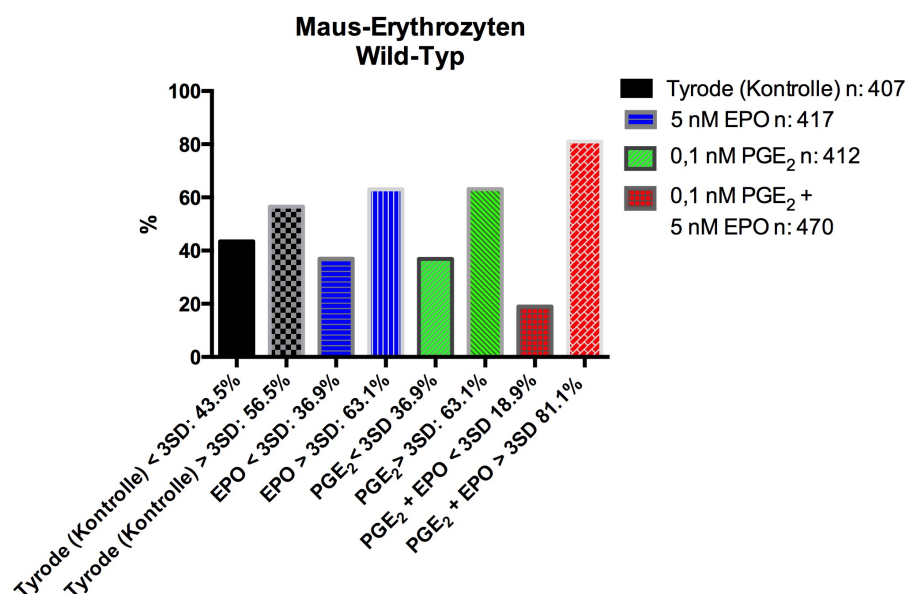
#### 4.3.3 Kalziumsignale bei Wildtyp Mäusen in Abhängigkeit von PGE<sub>2</sub> und EPO

Die prozentuale Verteilung der Responder und Nicht-Responder erfolgt bei den Erythrozyten Wildtyp Mäusen analog zu den humanen Spendererythrozyten, wobei eine Standardabweichung von > 3 SD als Wert für die Responder definiert wurde. Allerdings zeigt

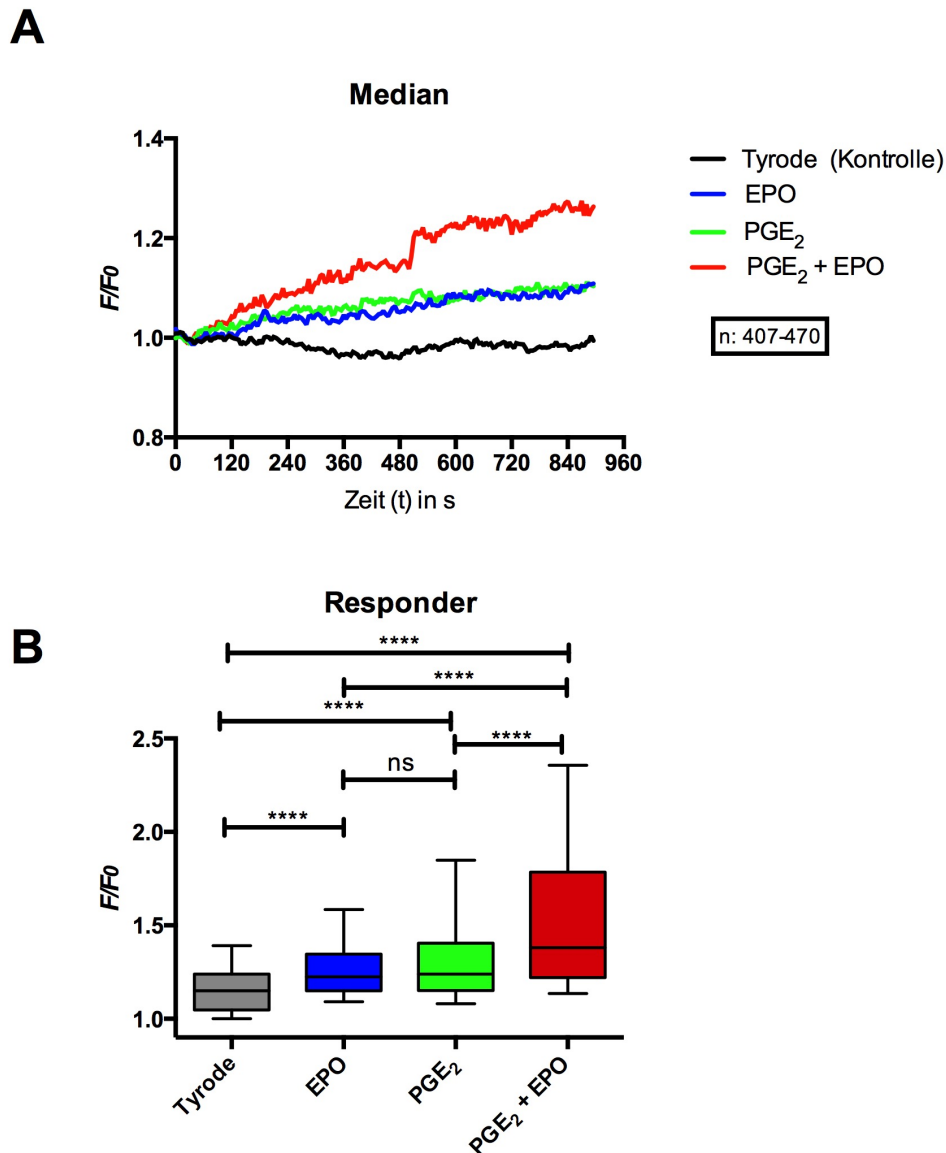


sich hier ein Anteil von 56,5% der Kontrollgruppe (Erythrozyten während der Beobachtungszeit nur unter isoosmolarem Tyrodezufluss) als Zellen die auch ohne Stimulation durch EPO oder Prostaglandin  $E_2$  während des Versuches mit einer  $F/F_0$ -Ratio  $> 3$  SD reagieren (siehe Abbildung 4.17). Durch Zugabe von 5 nM EPO oder 0,1 nM  $PGE_2$  steigt der Anteil der Responder auf jeweils 63,1%, ist also um 6,6% höher als ohne Stimulus. Bei Doppelstimulation mit 5 nM EPO zusammen mit 0,1 nM  $PGE_2$  steigt der Anteil der Responder sogar auf 81,1%. Betrachtet man die Kurven der einzelnen Versuchsgruppen auch hier in Abhängigkeit zur  $F/F_0$ -Ratio, zeigt sich im Unterschied zu den humanen Spendererythrozyten eine deutliche Zunahme der relativen intrazellulären Kalziumionenkonzentration in der EPO-Gruppe (Abb. 4.18 A, blaue Kurve). Es zeigen sich deutliche Überschneidungen in der EPO und der  $PGE_2$ - Gruppe. Ein weiterer Unterschied, ist dass die Kurve der Gruppe mit Doppelstimulation durch  $PGE_2 + EPO$  die größte Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt (rote Kurve).

Zur statistischen Auswertung wurden auch hier wieder die Responder der Versuchsgruppen mittels Mann-Whitney-Test auf ihre Unterschiede verglichen (Siehe Abbildung 4.18 B). Die doppelstimulierte Gruppe zeigt die deutlichste Zunahme der  $F/F_0$  Ratio, die auch zu allen anderen Kurven hoch-signifikant unterschiedlich ist (\*\*\*\* = p-Wert  $< 0,0001$ ). Sowohl die Stimulation mit EPO als auch die mit  $PGE_2$  (Abb. 4.18 B, blaue und grüne Box) zeigen eine signifikant höhere  $F/F_0$ -Ratio als die Kontrollgruppe, wobei zwischen der EPO-Gruppe und der  $PGE_2$ -Gruppe kein signifikanter Unterschied auszumachen ist. Im Vergleich zu den humane Erythrozyten zeigt sich bei den roten Blutzellen der Wild-Typ-Maus also eine deutliche Zunahme der relativen intrazellulären Kalziumionenkonzentration durch die Stimulation mit EPO, die sogar durch eine Doppelstimulation durch zusätzliche Zugabe von  $PGE_2$  nochmals signifikant erhöht werden kann.



**Abbildung 4.17: Prozentuale Verteilung der Wild-Typ Maus Erythrozyten.** Balkendiagramm zur prozentualen Verteilung der Erythrozyten die im Beobachtungszeitraum einen relativen intrazellulären Kalziumanstieg von  $< 3SD$  und  $> 3SD$  aufwiesen. Die Farbe der Säulen entspricht dabei den in der Legende (rechts) gezeigten Versuchsgruppen. Die beiden schwarzen Balken zeigen dabei die Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe zeigt sich ein Anteil von 56,5% Erythrozyten die mit einer  $F/F_0$ -Ratio  $> 3SD$  reagieren, ohne das eine Stimulation mit EPO oder  $PGE_2$  stattgefunden hat. Der Anteil steigt sowohl in der EPO als auch in der  $PGE_2$  – Gruppe auf 63,1% (blaue und grüne Balken). Durch Doppelstimulation mit  $PGE_2$  und EPO steigt der Anteil der Responder ( $F/F_0$ -Ratio  $> 3SD$ ) nochmals und betrifft dann 81,1% der Versuchsgruppe (rote Balken)



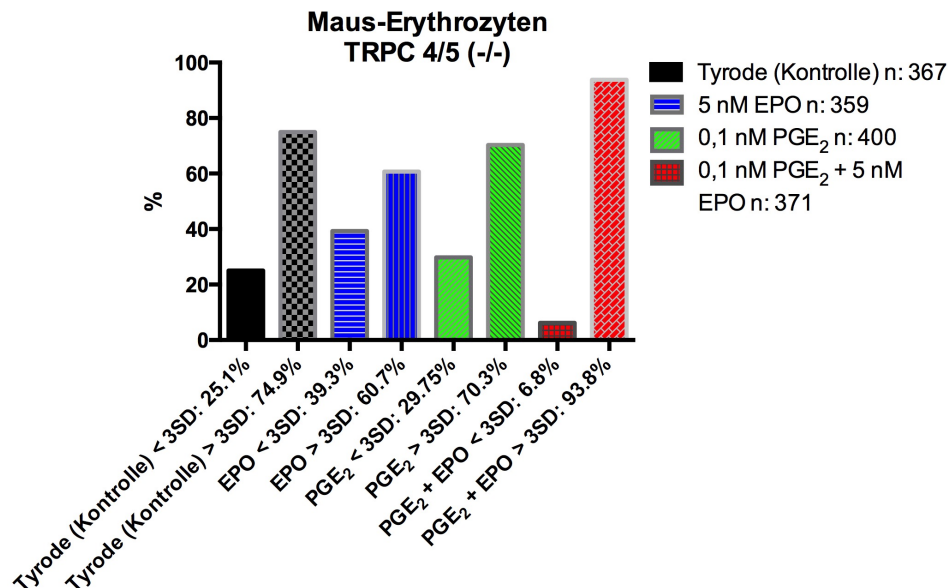
**Abbildung 4.18: Median und Responder der Versuchsgruppen bei Wild-Typ Maus Erythrozyten.** A zeigt die Mediane der Kontrollgruppe (schwarze Kurve) und der Versuchsgruppen (grüne, blaue und rote Kurve) als Kurven während der Beobachtungszeit und in Abhängigkeit zur  $F/F_0$ -Ratio. Die Legende rechts zeigt die zu den Kurven zugehörige Versuchsgruppe. Die Zahl der beobachteten Erythrozyten der einzelnen Versuchsgruppen ist im Kästchen darunter mit n: 407-470 angegeben. Analog dazu zeigt B das Verhalten der 3 Respondergruppen, bzw. der Gruppe von Erythrozyten die in der Kontrollgruppe mit einer Änderung ihrer  $F/F_0$ -Ratio  $> 3SD$  reagieren als Boxplots. Die  $F/F_0$ -Ratio der doppelstimulierten Gruppe signifikant höher bei den anderen gezeigten Versuchsgruppen. Außerdem zeigt sich unter den Respondern der EPO und der  $PGE_2$ -Gruppe kein signifikanter Unterschied. Vier Sternchen (\*\*\*\*) bedeutet das der p-Wert im Mann-Whitney Test  $< 0,0001$  ist. Nicht signifikante Werte sind durch ns abgekürzt.

#### 4.3.4 Kalziumsignale bei TRPC 4/5 (-/-) Knock-out Mäusen in Abhängigkeit von $PGE_2$ und EPO

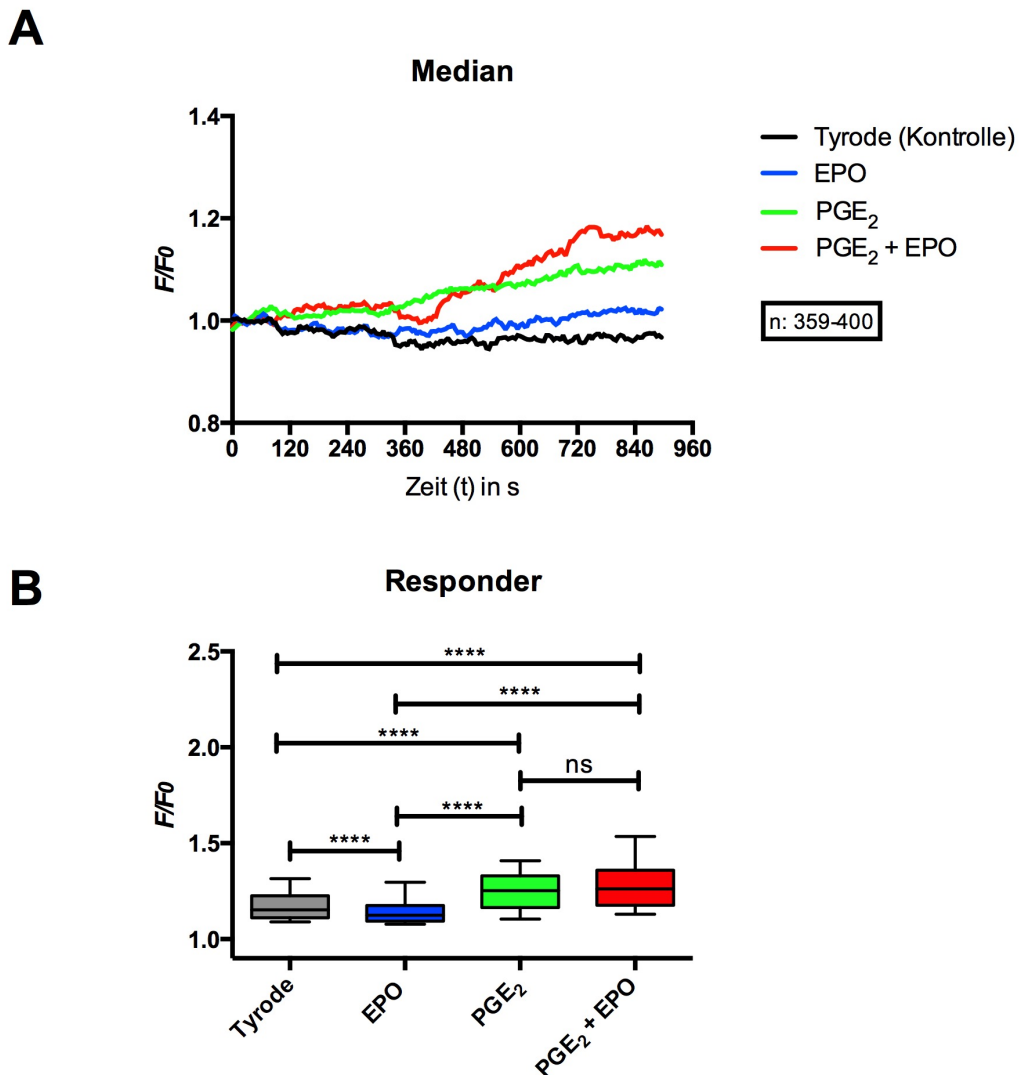
Die prozentuale Verteilung der Responder und Non-Responder ist in Abbildung 4.19 gezeigt wobei auch hier in die zuvor beschriebenen vier Versuchsgruppen (Kontrolle, EPO-Gruppe,  $PGE_2$ -Gruppe und  $PGE_2 + EPO$ -Gruppe) unterteilt wurde. Bei den TRPC 4/5 Doppel-



knock-out Mäusen (TRP C4/C5 dKO Mäuse) zeigt sich bereits bei der Verteilung der Kontrollgruppe ein noch differenzierteres Bild der Erythrozyten, die ohne Stimulus während der Beobachtungszeit eine  $F/F_0$ -Ratio  $> 3SD$  aufweisen (74,9%). In der EPO-Gruppe ist hier der prozentuale Wert im Vergleich zu den Wild-Typ Mäusen allerdings sehr rückläufig (Stimulation mit EPO führt bei den Wildtypmäusen zu einer prozentualen Zunahme der Responder um 6,6% gegenüber der Kontrollgruppe, hier Abnahme um 14,2%). Auch in der  $PGE_2$ -Gruppe geht der Anteil an Respondern leicht zurück, wogegen der Anteil von Respondern in der Gruppe mit  $PGE_2 + EPO$  Stimulation 93,8% beträgt und somit eine relative Erhöhung der Responder von 18,9% im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt. Abbildung 4.20 A zeigt die Mediane der vier Versuchsgruppen, wobei sich hier im Gegensatz zu den Erythrozyten der Wildtypgruppe und analog zu den humanen Spendererythrozyten viele Überschneidungen und nur ein geringer Unterschied der zwischen der Kontrollgruppe und der EPO - Gruppe zu sehen sind (schwarze und blaue Kurve). Ähnlich wie bei menschlichen und Wildtyp-Erythrozyten zeigt sich auch hier ein deutlicher Unterschied der  $PGE_2$  -Gruppe (grüne Kurve) zu Kontrollkurve. Die Doppelstimulation mit EPO +  $PGE_2$  führt bei den TRP C4/C5 dKO Mäusen ebenfalls zu einem Anstieg der  $F/F_0$ -Ratio, welcher zeitweise in näherer Umgebung zur  $PGE_2$  -Gruppe verläuft und zu Versuchsende hin dominiert. Um die Unterschiede statistisch genauer zu formulieren, wurden auch hier in Abbildung 4.20 B die Responder der Versuchsgruppen mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikant niedrigere  $F/F_0$ -Ratio bei der EPO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarzer vs. blauer Balken). Die Stimulation mit  $PGE_2$  bzw. mit  $PGE_2 + EPO$  zeigte jeweils eine signifikant höhere  $F/F_0$ -Ratio als die Kontrollgruppe (grüner und roter Balken). Anders als bei den Wildtyp-Mäusen führte die Doppelstimulation mit EPO +  $PGE_2$  hier allerdings zu keiner signifikanten Erhöhung der  $F/F_0$ -Ratio im Vergleich zur  $PGE_2$ -Gruppe.



**Abbildung 4.19: Prozentuale Verteilung der TRP C4/C5 dKO Maus Erythrozyten.** Balkendiagramm zur Darstellung der prozentualen Verteilung der Responder ( $F/F_0$ -Ratio  $> 3SD$ ) und Non-Responder ( $F/F_0$ -Ratio  $< 3SD$ ) bei den Erythrozyten der TRP C4/C5 dKO Mäuse. Die Legende rechts gibt die Farbkodierung und Anzahl der Zellen der jeweiligen Versuchsgruppe wieder. Es zeigt sich bereits ein hoher Anteil an Zellen die eine  $F/F_0$ -Ratio  $> 3 SD$  aufweisen in der Kontrollgruppe (74,9%, schwarz-kariierter Balken). In der doppelstimulierten Versuchsgruppe (rote Balken) ist der Anteil der Responder am Höchsten. Der Anteil an Respondern der EPO-Gruppe unterschreitet den Anteil der Responder in der Kontrollgruppe um 14,2%, die  $PGE_2$ -Gruppe hat einen um 4,6% niedrigeren Anteil an Respondern als die Kontrollgruppe.

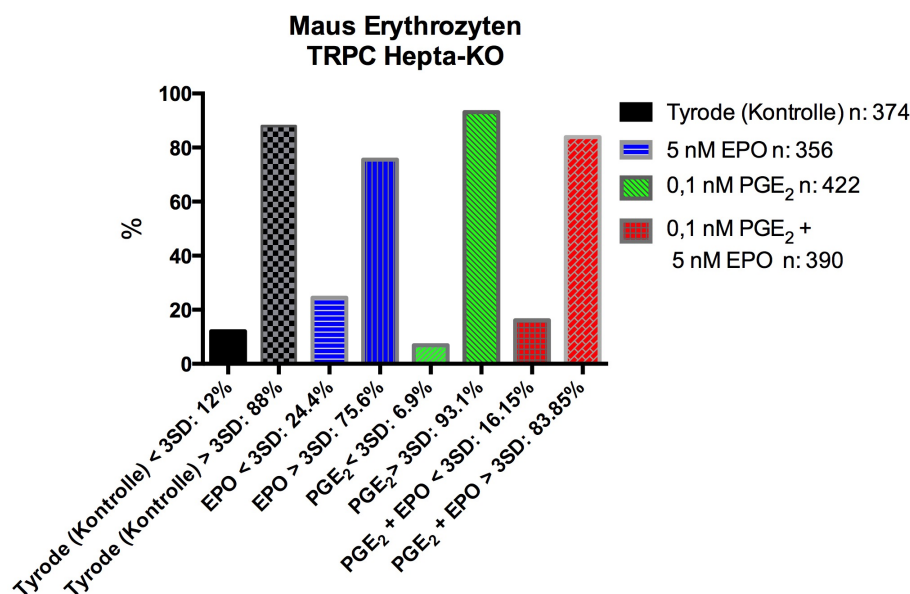


**Abbildung 4.20: Median und Responder der Versuchsgruppen bei TRP C4/C5 dKO Maus Erythrozyten.** A zeigt ein Kurvendiagramm der vier Versuchsgruppen, während der Beobachtungszeit  $t$  in s in Abhängigkeit zur  $F/F_0$ -Ratio. Die Legende rechts zeigt die zu den jeweiligen Kurven zugehörige Versuchsgruppe. Die Anzahl der gemessenen Zellen beträgt  $n: 359-400$ . Die Boxplots der Responder sind in B abgebildet. Die Beziehung und p-Wert der einzelnen Versuchsgruppen untereinander sind mit ihrer Signifikanzen im Mann-Whitney-Test abgebildet, wobei vier Sternchen (\*\*\*\*) einem p-Wert  $< 0,0001$  entsprechen. Nicht-signifikante Unterschiede sind mit (ns) markiert. Für genauere Angaben zu den Unterschieden und im Bezug auf die Erythrozyten der menschlichen Spender bzw. der Wildtyp-Mäuse siehe Text.

#### 4.3.5 Kalziumsignale bei TRPC Hepta-Knock-Out (-/-) Mäusen in Abhängigkeit von $PGE_2$ und EPO

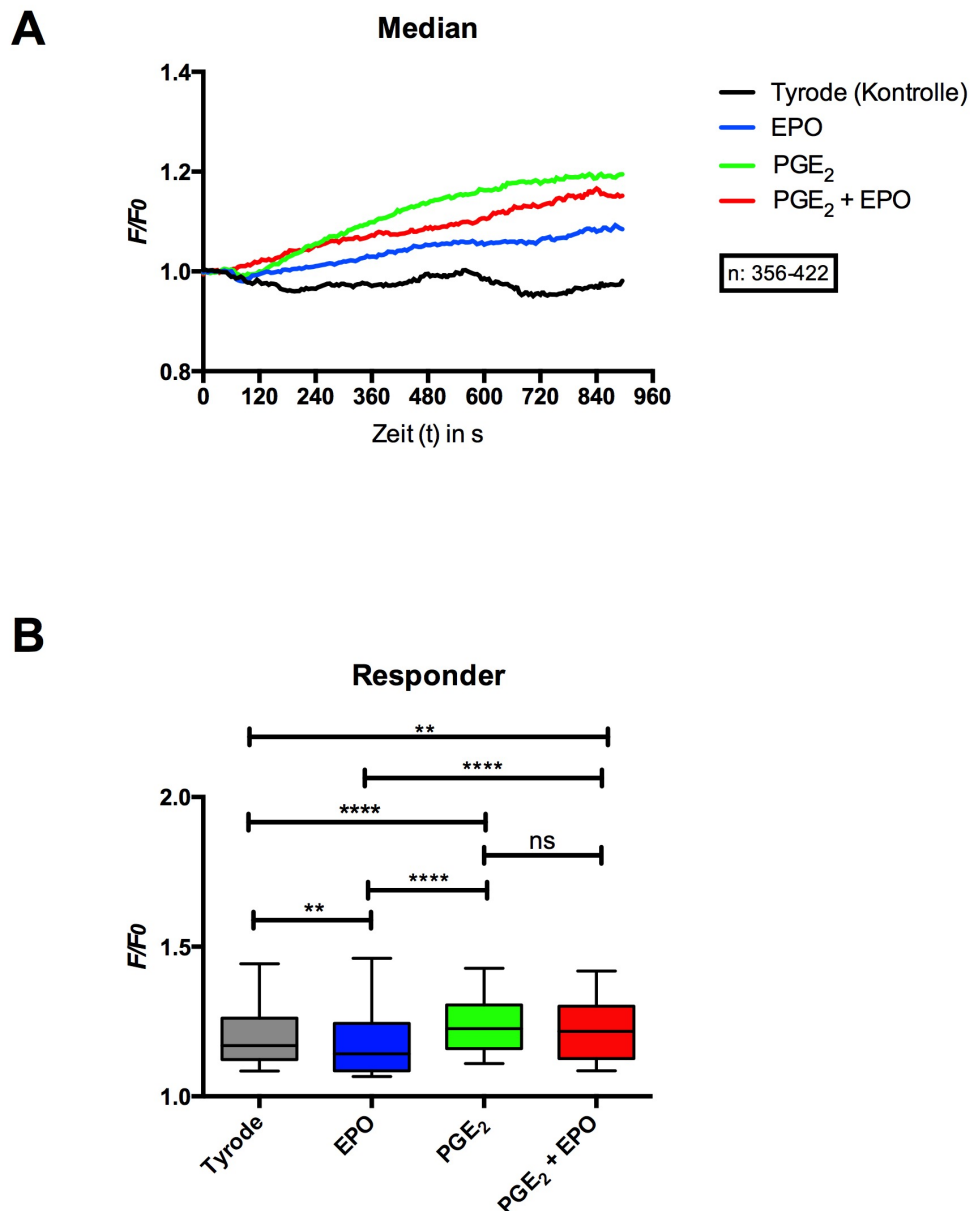
Bei den Erythrozyten der Mäuse ohne TRPC Kanäle (TRPC Hepta-KO) zeigt sich bereits in der Kontrollgruppe eine Ratio  $> 3$  SD bei 88% der Erythrozyten. Nur durch Zugabe von  $PGE_2$  steigt der Anteil an Respondern (Abb. 4.21, grüner Balken) weiter an und erreicht 93,1% aller

Zellen der Versuchgruppe (relative Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe von 5,1%). In der EPO-Gruppe ist der Anteil der Responder am Niedrigsten. Der relative Anteil ist gegenüber der Kontrollgruppe um 12,4% vermindert. Ähnliche Beobachtungen konnten schon bei den TRP C4/C5 KO Erythrozyten gemacht werden (relative Abnahme der Responder um 14,2%). Bei Doppelstimulation mit  $\text{PGE}_2$  + EPO wurde hier ebenfalls eine Minderung des relativen Responderanteils um 4,15% im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Diese relative Minderung des Responderanteils bei Doppelstimulation konnte bei den anderen Erythrozyten (humane Spender, Wildtyp-Maus und TRP C4/C5 KO Maus) nicht beobachtet werden. Die Verlaufskurven der Mediane der vier einzelnen Versuchsgruppen zeigen analog zu den Kurven der TRP C4/C5 KO Mäuse (bzw. auch andeutungsweise der humanen Spendererythrozyten) den höchsten Anstieg der  $\text{F}/\text{F}_0$ -Ratio in der  $\text{PGE}_2$  und der  $\text{PGE}_2$ +EPO- Gruppe (Abbildung 4.22 A, grüne und blaue Kurve). Die Kontrollgruppe zeigt, wie bei allen anderen Versuchen, eine  $\text{F}/\text{F}_0$ -Ratio die sich kaum vom Wert 1 abhebt (schwarze Kurve). Die Kurve der EPO-Gruppe (blaue Kurve) zeigt hier, trotz in Abb. 4.21 niedrigstem Anteil an Respondern, eine deutlich höhere  $\text{F}/\text{F}_0$ -Ratio als die Kontrollgruppe, bleibt aber trotzdem deutlich unter der  $\text{F}/\text{F}_0$ -Ratio der doppelstimulierten Gruppe. Um auch hier einen objektiven statistischen Vergleich der einzelnen Gruppen machen zu können, wurden in Abbildung 4.22 B die Responder der Versuchsgruppen im Kastendiagramm (Boxplot) verglichen. Alle Versuchsgruppen heben sich signifikant von der Kontrollgruppe ab. Die Responder der EPO-Gruppe sind mit einem p-Wert von 0,003 signifikant höher als die Kontrollgruppe. Bei Vergleich doppelstimulierten Erythrozyten mit der Kontrollgruppe zeigt sich ebenfalls eine signifikante höhere  $\text{F}/\text{F}_0$ -Ratio (p-Wert: 0,002). Die  $\text{PGE}_2$ -Gruppe zeigt eine Erhöhung der  $\text{F}/\text{F}_0$ -Ratio, die mit einem p-Wert von  $< 0,0001$  die höchste Signifikanz der Unterschiede zur Kontrollgruppe besitzt. Analog zu den TRP C4/C5 KO Mäusen zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Stimulation mit  $\text{PGE}_2$  und der Doppelstimulation mit  $\text{PGE}_2$  und EPO. Auch zeigt sich eine deutliche signifikant höhere  $\text{F}/\text{F}_0$ -Ratio der  $\text{PGE}_2$ -Gruppe als auch der  $\text{PGE}_2$  + EPO -Gruppe im Vergleich zur EPO-Gruppe (p-Wert jeweils  $< 0,0001$ ).



**Abbildung 4.21: Prozentuale Verteilung der TRPC Hepta-Knock-Out (-/-) Maus Erythrozyten.** Gezeigt ist die prozentuale Verteilung in Responder und Non-Responder der verschiedenen Versuchsgruppen im Balkendiagramm. Die Legende rechts zeigt die Zellzahl und Farbkodierung der entsprechenden Versuchsgruppe. Nur 12% der Kontrollgruppe (schwarzer Balken) zeigen während des Beobachtungszeitraumes eine Änderung ihrer  $\text{F}/\text{F}_0$ -Ratio  $< 3$  SD. Somit zeigen 88% der Erythrozyten in der Kontrollgruppe einen relativen intrazellulären Kalziumionenanstieg von mehr als 3 Standardabweichungen. In der EPO-Gruppe (blaue Balken)

sowie in der  $\text{PGE}_2$  + EPO -Gruppe (rote Balken) fällt der Anteil an Erythrozyten die eine  $F/F_0$ -Ratio  $> 3$  SD zeigen mit 75,6% bzw. 83,85% auf Werte unter der Kontrollgruppe. Nur in der  $\text{PGE}_2$ -Gruppe steigt der Anteil der Responder weiter auf 93,1% an.



**Abbildung 4.22: Median und Responder der Versuchsgruppen bei TRPC Hepta-Knock-Out (-/-) Maus Erythrozyten.** A zeigt ein Kurvendiagramm der verschiedenen Versuchsgruppen während des Beobachtungszeitraums in Abhängigkeit zur  $F/F_0$ -Ratio. Die schwarze Kurve zeigt dabei den Median der Erythrozyten in der Kontrollgruppe. Die grüne, blaue und rote Kurve illustrieren die Mediane der unterschiedlichen Versuchsgruppen entsprechend der Legende rechts. Das Kästchen darunter zeigt die Zahl der beobachteten Erythrozyten der einzelnen Versuchsgruppen (n: 356-422). B zeigt die Boxplots der Responder der drei Versuchsgruppen (blauer, grüner, roter Balken), sowie die Erythrozyten der Versuchsgruppe mit einer  $F/F_0$ -Ratio  $> 3$  SD. Die Signifikanz der Unterschiede im Mann-Whitney-Test ist über den Beziehungslinien der entsprechenden Balken angegeben, wobei vier Sternchen (\*\*\*\*) einem p-Wert  $< 0,0001$  entsprechen und ns = nicht signifikant bedeutet. Zwei Sternchen (\*\*) bedeutet eine Signifikanz  $> 0,001$  aber  $< 0,01$ . Für nähere Informationen zu den Unterschieden zwischen den einzelnen Kurven und Balken, auch im Bezug auf Vergleiche mit den Erythrozyten der Wildtyp-Mäuse, TRP C4/C5 KO Mäuse sowie der humanen Spender, siehe Text.

## 5. Diskussion

### 5.1 Kalziumsignalmessung bei mechanischer Stimulation und die Filtrierbarkeit von Erythrozyten

#### 5.1.1 Kalziumsignalmessung bei Änderung der Osmolarität

Dieser erste Versuch hatte das Ziel zu zeigen, ob es generell möglich ist, mit einem mechanischen Reiz auf die Erythrozytenmembran ein Kalziumsignal zu erzeugen. Der osmotische Druck wurde hier gewählt, um vorerst einen konstanten und auf die gesamte Membran gleichmäßig verteilten Reiz zu setzen. Durch das Herabsetzen der Umgebungsmolarität von 300 mosmol auf 200 mosmol kommt es, wie im Ergebnisteil gezeigt, zu einer schnellen und deutlichen Erhöhung der relativen intrazellulären Kalziumionenkonzentration, was für sich alleine natürlich nicht beweisend für die Existenz bzw. die Mitbeteiligung von mechanosensitiven Kationenkanäle, wie beispielsweise Piezo-1, an diesem Prozess ist. Weiterhin sehr uncharakteristisch, wenn auch nicht widersprüchlich, ist die Beobachtung, dass das Kalziumsignal bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nahezu konstant bleibt. Durch elektrophysiologische Patch-clamp Versuche an HEK-Zellen konnte gezeigt werden, dass einzelne mechanosensitive Kationenkanäle nach einmaliger kurzer Stimulation in eine inaktive Phase übergehen, in welcher sie auch durch höhere mechanische Stimulation kaum aktivierbar sind. Eine Messung der gesamten Zelle zeigte jedoch einen konstanten Strom, besonders für Kalziumionen, welcher dadurch begründbar ist, dass durch eine Dauerstimulation der Zelle die Inaktivierung der Piezo-1 Kanäle aufgehoben wird (Gottlieb P.A. et al. 2012). Da nach Umschalten des Systems auf 200 mosmol bis zum Ende der Beobachtungszeit keine Veränderungen am System getroffen wurden, ist davon auszugehen, dass durch die damit verbunden Zellschwellung ein konstanter gleichbleibender mechanischer Reiz auf die Membran gewirkt hat, der analog zu den Beobachtungen Gottliebs zu einer Dauerstimulation der mechanosensitiven Kanäle geführt hat. Somit ist eine gleichbleibende  $F/F_0$ -Ratio nach Änderung der Osmolarität durchaus zu erwarten und nicht widersprüchlich zu Kanalmessungen mittels zellgebundenen Patch-Clamp Methoden (engl.: "cell-attached mode"). Auch Lang F. et al. machten sich in Ihren Experimenten die osmotische Stimulation von Erythrozyten zu nutzen. Hier wurden allerdings stark hyperosmolare Lösungen verwendet (meist isotonische PBS + 500mM Sucrose) um einen osmotischen Schock auf die Zellen zu erzeugen und somit die Eryptose auszulösen. Lang F. et al. konnten dabei zeigen, dass durch osmotischen Schock die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration stark ansteigt und dadurch die Eryptose-Kaskade aktiviert wird (Lang F. et al. 2006). Weitere grundlegende Arbeiten im Bezug auf osmotischen Stress und Kalziumioneneinstrom beziehen sich meist auf das Zusammenspiel des erhöhten intrazellulären Kalziums und der damit verbunden Aktivierung des Gardos-Effektes (Bowdler A.J. et al. 1984, sowie Gardos G. 1958 oder Grygorczyk R. et al. 1984 ). Allen gemeinsam ist der, auch in meiner Arbeit gezeigte, Anstieg des intrazellulären Kalziums in Abhängigkeit des Durcks auf die Zellmembran. Interessant wären an dieser Stelle natürlich noch weitere Versuchsreihen mit auf- oder absteigenden Osmolaritäten oder Versuche, bei denen die Osmolarität nach einiger Zeit wieder dem Ausgangswert angepasst wird. Ich habe mich allerdings frühzeitig bewusst dagegen entschieden, Versuche in diese Richtung auszubauen, da die Intention dieses Versuchs darauf beruht, mit einfachen Mitteln einen gleichmäßigen Druck auf die Zellmembran aufzubauen und mit den gewonnenen Erkenntnissen die

folgenden Versuche zur mechanischen Stimulation der Erythrozyten zu begründen. Es ging mir hier ausschließlich um die Beantwortung der Frage, ob ein relativ unspezifischer Reiz, wie die Änderung des osmotischen Druckes in der Umgebung des Erythrozyten, zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums führt. Diese Frage wurde im Bezug auf die Weiterführung der nachfolgenden Versuche sowie Interpretation der Ergebnisse mit diesem Versuch ausreichend beantwortet.

Dennoch ist alleine für sich genommen die Beobachtung einer Kalziumionenzunahme im Erythrozyten kein sicherer Indikator dafür, dass mechanosensitive Kalziumionenkanäle in den Mechanismus der Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration involviert sind. Daher wurde der Versuch um eine weitere Komponente, nämlich den mechanosensitiven Kationenkanalinhibitor GsMTx-4, erweitert. Durch Zugabe des Inhibitors zeigt sich bei Änderung der Osmolarität von 300 mosmol auf 200 mosmol kein vergleichbarer Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration. Vielmehr konnte kein Unterschied zwischen den inhibierten Erythrozyten und einer Kontrollgruppe, ohne Änderung der Osmolarität, festgestellt werden. Durch diesen Versuch konnte also gezeigt werden, dass durch Hemmung der mechanosensitiven Kationenkanäle kein signifikanter Kalziumeinstrom in die Zelle stattfindet. Die Beobachtung zeigt, dass es durch unspezifische mechanische Reizung der Zelle zu einem Kalziumioneneinstrom kommt, der am ehesten über mechanosensitive Kationenkanäle vermittelt wird. Ob es sich dabei um den in der Einleitung beschriebenen Piezo-1 Kanal handelt, kann auch durch die hier beschriebenen Folgeversuche letztendlich nicht einwandfrei geklärt werden. Im Bezug auf die Klinik von Krankheiten, wie z.B. der hereditären Xerose, in Zusammenschau mit Ergebnissen der humangenetischen Untersuchung erkrankter Patienten erhärtet sich hier allerdings der Verdacht, dass zumindest funktionell Piezo-1 Kanäle oder mechanosensitive Kationenkanäle mit gleichartigen Eigenschaften auf der Oberfläche von humanen Erythrozyten zu finden sind und eine Rolle bei mechanisch vermittelten Kalziumioneneinstromen spielen.

### 5.1.2 Kalziumsignale bei direktem mechanischem Druck

Nachdem durch die Beobachtungen der Kalziumsignalmessung bei Änderung der Osmolarität die Vermutung naheliegt, dass mechanosensitive Kanäle bei diesem Prozess eine wichtige Rolle spielen, wurde hier im Folgenden ein direkter mechanischer Reiz auf die Zellmembran von Erythrozyten mit Hilfe einer Glaspipette ausgeübt. Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen und direkten Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration bei Aufsetzen und dem Verbleib der Pinzette auf der Erythrozytenmembran. Es zeigte sich, ähnlich wie zuvor schon beschrieben, ein Signal, welches nicht charakteristisch für die Einzelkanalbeobachtungen von Patch-clamp Versuchen an HEK-Zellen ist (Gottlieb P.A. et al. 2012). Dies ist auch hier damit zu erklären, dass nicht Einzelkanäle spezifisch aufgesucht und stimuliert wurden, sondern vielmehr auf einen Bereich der Membran ein direkter mechanischer Druck ausgeübt wurde, der über die gesamte Beobachtungszeit nach Aufsetzen der Pipette konstant blieb. Dydra A. et al. konnten zeigen, dass es durch lokale Deformation der Erythrozytenmembran zu einem Einstrom vom Kalzium in die Zelle kommt. Zwar wurde auch hier nicht funktionell die gesamte Zelle mittels Kalzium-Tracer betrachtet, sondern lediglich die Ströme per Patch-Clamp-Methoden gemessen, dennoch konnte konform zu meinen Ergebnissen ein schneller Kalziumioneneinstrom nach mechanischer Deformation der Membran beobachtet werden.

Ein Zurückziehen der Pipette wurde bewusst vermieden, da sich bereits früh in der Ausarbeitung der Methodik gezeigt hat, dass durch Abziehen der Pipette bei fast allen

Erythrozyten Bewegungsartefakte und Verschiebungen aus dem Fokus des Beobachtungsfeldes entstanden, die eine valide Messung der Kalziumionenverhältnisse nicht mehr möglich gemacht hätten. Außerdem ist anzumerken, dass mechanische Reizung eines ruhenden Erythrozyten nicht die physiologischen Gegebenheiten eines Erythrozyten im Blutkreislauf darstellt. Adhäsionen am Objektträger und Verformungen, durch das Aufliegen auf eben diesem, sind u.a. Gründe, warum sich hier nur wenige Aussagen über das Verhalten des Erythrozyten im physiologischen Blutstrom machen ließen. Eine Methodik, welche es erlaubt die Pipette beliebig oft auf die Zelle aufzusetzen und wieder zurückzuziehen, ohne dass es zu beschriebenen Artefakten kommt, würde hier also nur wenig Informationsgewinn im Bezug auf das physiologische Verhalten des Erythrozyten in vivo liefern und wurde somit bewusst nicht weiter ausgearbeitet. Die hauptsächliche Fragestellung dieses Versuches bestand somit darin, zu zeigen, dass ein direkter mechanischer Reiz auf der Erythrozytenmembran zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration führt und dass diese Änderung durch die Beteiligung von mechanosensitiven Kationenkanälen erfolgt. Durch die Verwendung von Calcein Red-Orange konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Kalziumeinstrom nicht durch Beschädigung der Zellmembran ausgelöst wurde, sondern am ehesten kanalvermittelt zu erklären ist. Auch zeigten einzelne Zellen, die durch die Pipette beschädigt wurden, in der Regel einen raschen und hohen Kalziumionenanstieg, welcher nicht mit den gezeigten Ergebnissen einer kanalvermittelten Kalziumionenerhöhung vereinbar wäre. Zusätzlich ist zu bemerken, dass beschädigte Erythrozyten den Beobachtungszeitraum von 20 Sekunden nicht überlebt hätten, da die mechanische Beschädigung der Erythrozytenmembran meist die Lyse der gesamten Zelle binnen weniger Millisekunden zur Folge hat.

Eine weitere Kernaussage lässt sich auch hier durch die Verwendung von GsMTx-4 treffen. Durch Inhibierung der mechanosensitiven Kationenkanäle bleibt ein Kalziumionenanstieg in den Erythrozyten bei direktem mechanischem Druck aus. Es zeigt sich im Verlauf sogar ein leichter Kalziumionenabfall im Vergleich zur Kontrollgruppe, welcher die Vermutung nahelegt, dass durch den mechanischen Reiz in Verbindung mit einer unterbundenen Kalziumantwort andere Signalkaskaden aktiviert werden. Mögliche Spekulationen reichen hier von sekundären Verdünnungseffekten durch die gestörte Homöostase durch die inhibierten Kationenkanäle, bis hin zu Ersatzkaskaden, welche aktiv Kalziumionen aus der Zelle pumpen.

Desweiteren wurde in diesem Experiment beobachtet, dass der Kalziumioneneinstrom lokal um die Stelle des Reizes höher ist, als über der gesamten Zelle. Diese Beobachtung wäre charakteristisch und damit zu erklären, dass eben dort, wo der mechanische Reiz am Größten ist, auch entsprechend die meisten Kationenkanäle aktiviert werden und hier die meisten Kalziumionen in die Zelle strömen. Es zeigt sich sowohl im Median als auch im Maximum ein signifikanter Unterschied bei Beobachtung des Signals lokal vs. gesamte Zelle. Die Aussagekraft der Beobachtungen bleibt allerdings aus bereits genannten Gründen begrenzt, da eine ruhende Zelle in vitro nicht den physiologischen Bedingungen im Blutstrom nahe kommt. Der weitere Ausbau der Experimente in Richtung dynamischer Verfahren bleibt daher unumgänglich, um klare Aussagen über das Verhalten der Erythrozyten in vivo treffen zu können.

Dennoch lässt sich hier in Zusammenschluss der Ergebnisse sagen, dass ein mechanischer Reiz zu einem adäquaten Kalziumioneneinstrom in Erythrozyten führt, welcher durch die Anwesenheit mechanosensitiver Kationenkanälen begründbar ist, die in Funktion und Aufgabe am ehesten Piezo-1 ähneln. Desweiteren lässt sich zeigen, dass der Einstrom von Kalziumionen über der Erythrozytenmembran am stärksten in der Umgebung ausgeprägt ist, welche mechanisch gereizt wird. Eine Membranschädigung oder die Involvierung nicht-

mechanosensitiver Kationenkanäle als Erklärung für den Kalziumeinstrom auf mechanischen Reiz kann durch die Verwendung von CRO bzw. GsMTx-4 nahezu ausgeschlossen werden.

### 5.1.3 Kalziumsignale im Kapillarmodell

Durch die Auswertung der statischen Versuche konnte gezeigt werden, dass in ruhenden Erythrozyten ein signifikanter Kalziumioneneinstrom bei mechanischer Stimulation der Zellen zu beobachten ist. Die Ergebnisse sind am ehesten durch die Beteiligung mechanosensitiver Kationenkanäle zu erklären. Dafür spricht neben den funktionellen Beobachtungen vor allem das Ausbleiben des Kalziumioneneinstroms bei Inhibierung durch GsMTx-4.

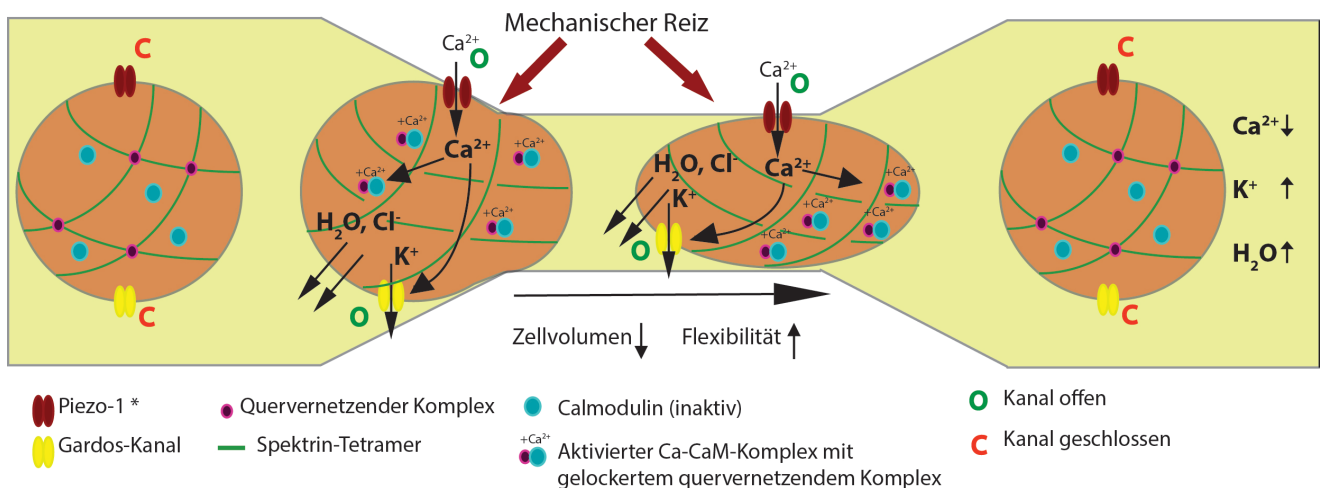
Durch die Anwendung von Kapillarmodellen, bei Zuhilfenahme von Erkenntnissen der zuvor beschriebenen statischen Versuche, konnte erstmals ein dynamisches Verfahren ausgearbeitet werden, dass die relative intrazelluläre Kalziumionenkonzentration in Erythrozyten vor, während und nach Passage einer Engstelle *in vitro* zeigt. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Zunahme der intrazellulären Kalziumionenkonzentration bei Passage der Engstelle. Anders als bei den statischen Versuchen konnte hier auch die Vermutung bestätigt werden, dass nach Passage der Engstelle, also bei Wegfall des mechanischen Reizes, die relative intrazelluläre Kalziumionenkonzentration wieder auf Werte vor Passage der Engstelle fällt. Somit sind die funktionellen Ergebnisse durchaus vereinbar mit den von Gottlieb P.A. et al. 2012 gezeigten Ergebnissen der Patch-Clamp Versuche. Der sekundenschnelle Abfall der relativen Kalziumionenkonzentration nach Passage der Engstelle lässt sich durch die Kalziumpumpe begründen. Die Plasma Membran Kalzium Pumpe (PMCA) wurde von Lew V. et al. bereits 1975 im Erythrozyten beschrieben. Sie ist hocheffektiv und sorgt dafür, dass ATP-abhängig Kalziumionen aus dem Erythrozyten gepumpt werden und ermöglicht somit die Aufrechterhaltung des Kalziumionengradienten (Bogdanova et al. 2013).

Versuche im Kapillarmodell mit dem Inhibitor für mechanosensitive Kationenkanäle (GsMTx-4) konnten leider nicht ausgewertet werden. Die Problematik bestand darin, dass bereits die Zugabe von GsMTx-4 in minimalen Konzentrationen zum Verstopfen der Kapillare führte. Die verwendeten Kapillarmodelle entsprachen dabei nur bedingt den physiologischen Gegebenheiten im Bezug auf die Größe der Querschnittsfläche des humanen Kapillarsystems. Im Kapillargebiet des Modells halbierte sich der Gesamtquerschnitt im Vergleich zur Vorkammer. Dadurch entstand ein äußerst sensibles Gleichgewicht, welches durch die Verstopfung mehrerer Kapillarräste scheinbar so gestört wurde, dass keine adäquate Kalziumsignalmessung der einzelnen Erythrozyten möglich und sinnvoll gewesen wäre. Allerdings gibt diese Beobachtung, eben auch in Zusammenschau mit den Berichten über Patienten mit hereditärer Xerocytoze, Anhalt zur Vermutung, dass bei der Passage von Engstellen die Funktion von mechanosensitiven Kationenkanälen eine wichtige Rolle spielt. Symptome, wie beispielsweise die von Andolfo, I. et al. 2013 beschriebenen Splenomegalien im Zusammenhang mit hämolytischen Anämien bei Xerocytoze-Patienten mit Piezo-1 Mutation, könnten dadurch erklärt werden, dass durch mangelnden Kalziumioneneinstrom in Erythrozyten die Rigidität und das Volumen der Zellen nicht an die Umwelt angepasst werden können und die Milzsinusoide verstopfen. Auch die beobachtete höhere Rate an thromboembolischen Ereignissen nach Splenektomie der betroffenen Patienten, könnte in diesem Zusammenhang damit erklärt werden, dass nach Wegfall der Milz als „Filterorgan“ für rigide Erythrozyten eben diese an anderen Engstellen hängen bleiben und hier den Blutfluss behindern. Die weiteren Untersuchungen von Erythrozyten betroffener Patienten und *in vivo* Experimente mit geeigneten Versuchstieren sind hier zur Klärung dieser Vermutungen



unabdingbar und können im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig belegt werden.

Die Hypothese eines Mechanismus im Bezug auf Funktion und Signalkaskade bei mechanischer Reizung eines Erythrozyten ist in Abbildung 1 dargestellt. Bekannt ist hierbei bereits, dass durch eine Erhöhung der intrazellulären freien Kalziumionen, Calmodulin und der Gardos-Kanal aktiviert werden (Bogdanova A. et al. 2013). Calmodulin führt durch Interaktion mit dem Zytoskelett zur vermehrten Zellflexibilität und die Aktivierung des Gardos-Kanals führt u.a. durch den Ausstrom von Kalium- und Chloridionen und somit zu einem passiven Austritt von Wasser zu einer Verminderung des Zellvolumens (siehe auch Einleitung 1.6 und 1.7). Für die Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration kommt nach den Erkenntnissen dieser Arbeit am ehesten ein mechanosensitiver Kationenkanal in Betracht, der durchlässig für Kalziumionen ist und sich durch GsMTx-4 inhibieren lässt. Ob es sich dabei um den Piezo-1 Kanal handelt, lässt sich durch diese Arbeit nicht abschließend eruieren; dennoch muss zumindest ein funktionell analoger Kanal am Anfang der gezeigten Signalkaskade stehen. Auch neuere Arbeiten mit Piezo-1 Knock-Out Mäusen (Cahalan SM et al. 2015) konnten konform zu meiner Arbeit zeigen, dass die Aktivierung von Piezo-1 Kanälen zu einer Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration führt und durch Aktivierung kalziumabhängiger Kaliumkanäle das Volumen der Erythrozyten reduziert wird. Auch das bereits in der Einleitung beschriebene Zebrafischexperiment von Faucherre A. et al. 2014 zeigte eine Volumenreduktion der Erythrozyten durch Aktivierung der Piezo-1 Kanäle.



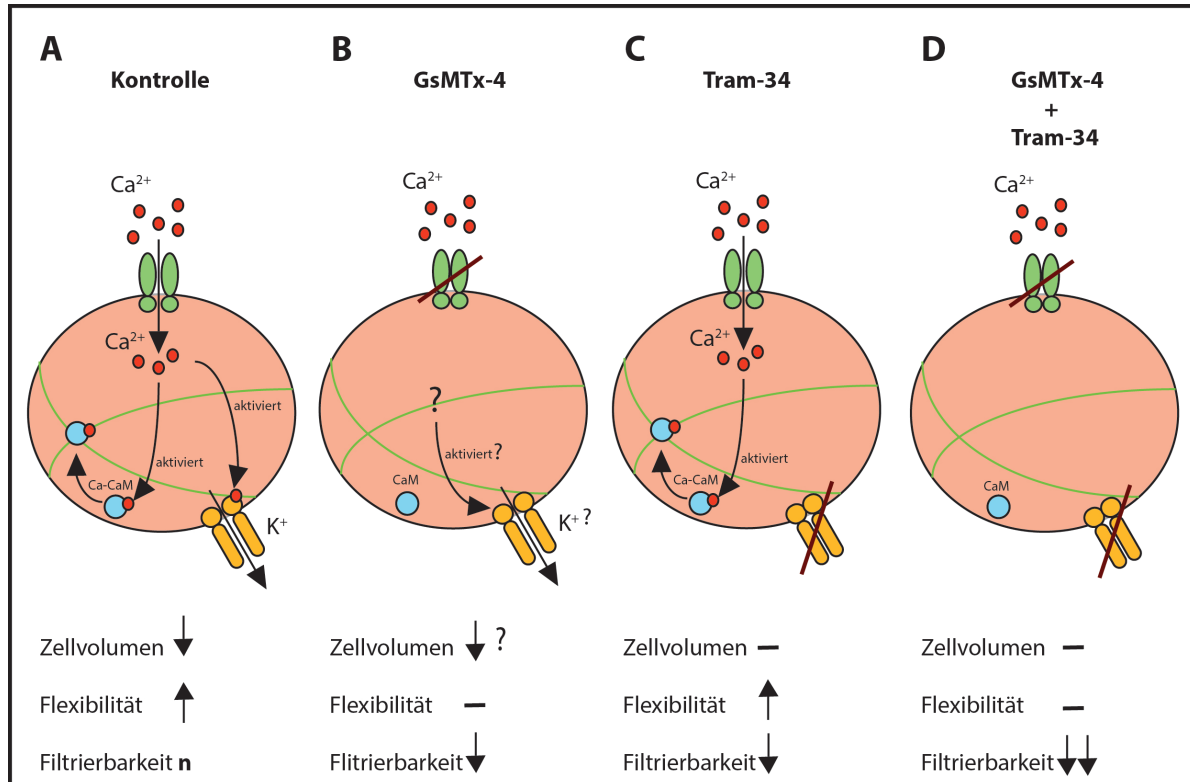
**Abbildung 5.1: Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade bei mechanischem Reiz.** Schematische Darstellung der intrazellulären Signalkaskade. Durch Kompression des Erythrozyten bei Passage einer Engstelle, wird ein mechanischer Reiz (roter Pfeil) auf die Zellmembran ausgeübt. Dadurch kommt es zur Aktivierung von mechanosensitiven Kationenkanälen (roter Kanal wechselt von geschlossen zu offen). Durch Öffnung des mechanosensitiven Kanals kommt es zu einem schnellen Kalziumioneneinstrom in die Zelle. Die Kalziumionen aktivieren den Gardos-Kanal (gelber Kanal wechselt von geschlossenem zu offenem Zustand). Dadurch kommt es zu einem Ausstrom von Kalium- und Chloridionen, was eine Volumenreduktion der Zelle durch den passiven Ausstrom von Wasser zur Folge hat. Außerdem formen die Kalziumionen den Kalzium-Calmodulin-Komplex (Ca-CaM-Komplex). Dadurch wird der zuvor stabile quervernetzende Komplex aus Aktin, Adducin und Bande 4.1 (lila Kreis) gelockert und das starre Spektринgerüst (grüne Linien) wird beweglicher. Somit nimmt durch die Bindung des Ca-CaM-Komplexes an den quervernetzenden Komplex (blauer und lila -Kreis), die Flexibilität der Zelle zu. Nach Passage der Engstelle schließt der mechanosensitive Kanal, wodurch der Kalziumioneneinstrom nachlässt und der Gardos-Kanal schließt. Außerdem wird der Ca-CaM-Komplex inaktiviert (blauer Kreis), wodurch Calmodulin wieder vom quervernetzenden Komplex abdiffundiert und somit wieder ein stabiler quervernetzter Komplex zwischen den Spektринtetrameren entsteht.

\* Der beteiligte mechanosensitive Kationenkanal wurde in der Abbildung zur Vereinfachung als Piezo-1 bezeichnet.

## 5.2 Filtrierbarkeit von Erythrozyten

Das Zusammenspiel von mechanosensitiven und Gardos-Kanälen scheint, nach meinen Ergebnissen, eine entscheidende Rolle für Erythrozyten bei der Passage von Engstellen zu spielen. Erhöhung der Flexibilität und die Abnahme des Zellvolumens sind wichtige Werkzeuge, mit denen es der Erythrozyt schafft, Kapillare und Sinusoide zu passieren, die im Durchmesser kleiner sind als der durchschnittliche physiologische Zelldurchmesser von 7,5 µm. Erythrozyten, die diese Eigenschaft verlieren, stellen eine vitale Bedrohung für den gesamten Organismus dar, da sie im schlimmsten Fall die Mikrozirkulation lebenswichtiger Organe behindern. Wie bereits bei der Kalziumsignalmessung bei Änderung der Osmolarität gezeigt, zeigen verschiedene grundlegende Arbeiten den Zusammenhang zwischen der Erhöhung des intrazellulären Kalziums und Abnahme des Zellvolumens durch Kaliumausstrom und damit sekundärem Wasserverlust (Bowdler A.J. et al. 1984, sowie Gardos G. 1958 oder Grygorczyk R. et al. 1984). Auch bei der Filtrierbarkeit von Erythrozyten durch entsprechende Zellulosefilter konnte ich zeigen, dass bei Inhibierung eines der beiden Kanäle eine signifikante Abnahme der Filtrierbarkeit im Bezug auf die Kontrollgruppe stattfindet. Blockiert man beide Kanäle, ist die Abnahme nochmals signifikant größer. Eine mögliche Erklärung dafür ist in Abbildung 2 dargestellt und gibt Grund zur Annahme, dass mechanosensitive Kationenkanäle, wie der Piezo-1 Kanal, und der Gardos-Kanal in ihrer Bedeutung und Funktion eng miteinander verknüpft sind. Eine Blockierung der mechanosensitiven Kationenkanäle mittels GsMTx-4 zeigt demnach signifikant schlechtere Filtrierbarkeit als die Kontrollgruppe. Dies ist, unter Betrachtung der vorangegangenen Versuche und Ergebnisse, am ehesten dadurch zu erklären, dass durch den gehemmten Kalziumioneneinfluss kalziumabhängige Signalkaskaden gehemmt werden, deren Aktivierung essentiell mit dem Volumen und der Flexibilität der einzelnen Erythrozyten zusammenhängt. Eine Inaktivierung dieser Signalkaskade erschwert zwar die Filtrierbarkeit, macht sie allerdings nicht unmöglich. Dies lässt vermuten, dass es wohl noch weitere Signalkaskaden gibt, die Einfluss auf die Rigidität und das Volumen der roten Blutzellen haben, die allerdings ineffektiver sind, als der mechanisch-aktivierte kalziumabhängige Signalweg. Durch diese Vermutung lässt sich auch erklären, warum sowohl durch Inhibition des Gardos-Kanals, als auch der mechanosensitiven Kanäle, eine ineffektivere Filtrierbarkeit der Erythrozyten provoziert wird, als durch Blockung einer der beiden Kanäle. Bei Wegfall des Kalziumsignals durch die mechanosensitiven Kanäle, bei nicht-inhibierten Gardos-Kanälen, wäre ein Mechanismus denkbar, der die Gardos-Kanäle kalziumunabhängig aktiviert und es somit trotz fehlendem Kalziumsignals dennoch zu einer Aktivierung ebendieser Kanäle kommt. Die Rigidität der Zelle bleibt erhalten, da sich kein Kalzium-Calmodulin-Komplex bilden kann; das Volumen der Zelle sinkt allerdings, was die Filtrierbarkeit des Erythrozyten verbessert. Wenn man allerdings zusätzlich auch noch den Gardos-Kanal inhibiert und somit auch die Volumenreduktion der Zelle blockt, wird die Filtration nochmals ineffektiver als durch alleinige Hemmung der flexibilitätsfördernden Prozesse. Um diese Vermutungen letztendlich beweisen und erklären zu können, sind allerdings noch einige Fragen durch nachfolgende Versuche und Arbeiten zu klären. Gerade im Bezug auf die Filtrierbarkeit in Abhängigkeit des Alters der Zelle, der Proteinverteilung, der Expression von Membranproteinen oder überhaupt des Mechanismus, wie eine Zelle ohne Zellkern im Mittel 120 Tage überleben kann, ohne selbst die Möglichkeit zu haben Proteine zu produzieren, wirft noch viele Fragen auf, die im Rahmen dieser Arbeit unmöglich geklärt werden können. Ein besonderes Augenmerk sollte hier meines Erachtens auf die Methodik gelegt werden. Das hier angewandte Verfahren zur Filterung von Erythrozyten, könnte gerade im Bezug auf seltene Mutationen der Gardos-Kanäle oder eben auch bei Patienten mit hereditärer Xerocytoze ein interessantes diagnostisches Mittel sein. Ein Vergleich der

Filtrierbarkeit von Erythrozyten verschiedener Patienten oder Kontrollgruppen lässt sich hiermit relativ schnell, effektiv und kostengünstig durchführen und erlaubt bei gegebener Fragestellung beispielsweise auch einen funktionellen Vergleich verschiedener Versuchsgruppen mit entsprechend relevanter Pharmakotherapie.



**Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Signalwege während der Filterung von Erythrozyten mit den Inhibitoren GsMTx-4 und Tram-34.** A zeigt die bereits aus Abb. 1 bekannte Signalkaskade bei mechanischer Stimulation der Zellmembran. Durch Aktivierung mechanosensitiver Kalziumkanäle (grüne Kanäle) kommt es zum Einstrom von Kalziumionen (rot). Diese wiederum aktivieren Calmodulin (blau) und Gardos-Kanäle (gelb). Dadurch kommt es zu den bereits erwähnten Anpassungsprozessen, nämlich der Volumenreduktion und der Erhöhung der Flexibilität (Filtrierbarkeit  $n$  = normal). B zeigt dieselbe Grafik bei Inaktivierung der mechanosensitiven Kationenkanäle. Es kommt zu keinem intrazellulären Kalziumionenanstieg und somit auch nicht zur Bildung von Kalzium-Calmodulin-Komplexen, welche die Quervernetzung des Zytoskeletts lockern. Eine fragliche kalziumunabhängige Aktivierung der Gardos-Kanäle, die eventuell zu einer Volumenreduktion führt und somit die Filtrierbarkeit dennoch positiv beeinflusst, wurde hier der Verständlichkeit wegen ergänzt. Durch Inhibierung der Gardos-Kanäle, kommt es, wie in C gezeigt, zwar nicht über eine adäquate Volumenreduktion über den Gardos-Kanal-vermittelten Kaliumionenaustritt (Chloridionen und Wasser folgen passiv), dennoch können durch eine Erhöhung der Kalziumionenkonzentration Ca-CaM Komplexe gebildet werden, die die Flexibilität des Erythrozyten erhöhen. Der in D gezeigte Wegfall beider Kanäle durch den gleichzeitigen Einsatz von Tram-34 und GsMTx-4 hat zur Folge, dass der Erythrozyt weder sein Volumen, noch seine Rigidität an den mechanischen Reiz anpassen kann. Die Filtrierbarkeit ist hier am Schlechtesten (vgl. Ergebnisteil 1.4).

### 5.3 Kalziumsignalmessung bei hormoneller Stimulation

#### 5.3.1 Kalziumsignale bei humanen Spendern in Abhängigkeit von PGE<sub>2</sub> und EPO

Wie bereits u.a. von Li Q. et al. 1996 und Wang J. et al. 2014 beschrieben, konnte hier bestätigt werden, dass bei Stimulation mit PGE<sub>2</sub> ein signifikanter Einstrom von Kalziumionen in humane Spendererythrozyten zu sehen ist. Li konnte außerdem zeigen, dass nicht alle Erythrozyten auf eine Stimulation mit PGE<sub>2</sub> reagieren, vielmehr konnte er bei seinen Versuchen nur ca. 15% der humanen Erythrozyten als „Responder“ identifizieren. Des Weiteren konnten Li. Q. et al. eine Reduktion des Zellvolumens von ca. 10% bei den respondierenden roten Blutzellen feststellen, die durch die Aktivierung der kalziumabhängigen Gardos-Kanäle begründet wurde. Auch Wang J. et al. konnten 2014 zeigen, dass es durch PGE<sub>2</sub> zu einem Kalziumeinstrom in Erythrozyten kommt. Analog zu den Ergebnissen Wangs zeigten meine Ergebnisse, dass der PGE<sub>2</sub>-stimulierte Kalziumioneneinstrom durch Erythropoetin inhibiert werden kann und am ehesten über die Offenheitswahrscheinlichkeit von TRPC6 reguliert wird. Somit bestätigt sich in meinen Versuchen die bereits publizierte These, dass TRPC6 an der hormonellen Regulation der intrazellulären Kalziumionenkonzentration von Erythrozyten beteiligt ist. Denkbar ist hier zum Beispiel, dass es bei gesunden Menschen in hypoxischen Gegebenheiten (beispielsweise Höhentraining), durch den vermehrten Ausstoß körpereigenen EPOs, zum einen zu einer, durch das Training gewünschten, Steigerung der Erythropoese kommt, zum anderen aber auch zu einer verminderten Eryptose und somit zu einer hormonell aktivierten verlängerten mittleren Überlebenszeit der bereits adulten Erythrozyten. Die kalziuminduzierte Eryptose wird also über TRPC6 Inhibierung durch EPO gehemmt. Die gezeigte prozentuale Verteilung der gezeigten Responder, also der Zellen, bei denen der Effekt beobachtet wurde, liegt hier bei 13,4% der gesamten Zellen. Betrachtet man aus der Gesamtheit also nur die Responder, sieht man dennoch einen signifikanten Unterschied zwischen der PGE<sub>2</sub>-Gruppe und der EPO-Gruppe. Auch dieses ist konform mit den Ergebnissen Wangs et al. 2014, welcher beschreibt, dass Erythrozyten altersabhängig in ihrer Kalziumkonzentration alternieren und besonders ältere Zellen ein erhöhtes Maß an freien intrazellulären Kalziumionen zeigen. Das legt die Vermutung nahe, dass auch durch die hormonelle Stimulation besonders ältere Zellen betroffen sind. Um diese Vermutung zu klären, sind allerdings noch Folgeexperimente notwendig, die sich speziell mit der Fragestellung auseinandersetzen, wie sich die hormonelle Stimulierbarkeit von Erythrozyten über die Zeit verändert. In den hier gezeigten Versuchen wurde das Hauptaugenmerk eher auf die Stimulierbarkeit bzw. die generelle funktionelle und tatsächliche Existenz verschiedener TRPC-Kanäle auf humanen Erythrozyten gelegt und im weiteren deren Vergleichbarkeit mit Wildtyp-Mauserythrozyten und diversen TRPC Knock-out Mäusen gelegt.

#### 5.3.2 Kalziumsignale bei Wildtyp Mäusen in Abhängigkeit von PGE<sub>2</sub> und EPO

Die Erythrozyten der Wildtyp-Mäuse reagieren hier unterschiedlich, zu den eben betrachteten humanen Erythrozyten. Sowohl durch EPO, als auch durch PGE<sub>2</sub> kommt es zu einem ähnlichen Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration. Durch Doppelstimulation wird dieser Effekt sogar noch verstärkt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es bei Mäusen eine andere TRPC-Kanalverteilung als bei Menschen gibt, bzw. dass es generell unterschiedliche TRPC Untergruppen mit unterschiedlichen Aufgaben gibt. Hier scheint es für die Maus einen Vorteil zu bringen, sowohl durch hormonelle Stimulation mit PGE<sub>2</sub> oder

EPO die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu erhöhen. Denkbar wäre hier eine komplett andere Strategie im Umgang mit hypoxischen Situationen im Vergleich zum Menschen. Sicher kommt es bei der Maus ebenfalls durch EPO-Stimulation zu einer gesteigerten Erythropoese mit entsprechender Erhöhung der Retikulozyten. Anders als bei Menschen, ist hier aber keine gehemmte Eryptose gewünscht, vielmehr wird durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration die mittlere Überlebenszeit der Erythrozyten reduziert. Dieser zunächst paradox erscheinende Erklärungsansatz wird allerdings etwas durchsichtiger, wenn man sich die Verteilung der Responder-Erythrozyten der untersuchten Wildtyp-Mäuse anschaut. Hier wird ersichtlich, dass bereits 56,5% der Erythrozyten ohne hormonelle Stimulation während des Versuchs ihre intrazelluläre Kalziumkonzentration um mehr als 3 Standardabweichungen erhöhen. Insgesamt zeigten sich die Kontrollzellen der Maus also schon ohne Stimulation als sehr unbeständig in ihrer Kalziumkonzentration. Durch Zugabe von EPO, PGE<sub>2</sub> oder beiden Hormonen, konnten sogar 63,1% bzw. 81,1% der gesamten Zellen der Responder-Gruppe zugeordnet werden. Diese hohe prozentuale Beteiligung, kann unmöglich mit der beim Menschen beschriebenen TRPC-6 vermittelten Regulation erklärt werden. Daher legt diese Beobachtung nahe, dass es bei Mäusen andere TRPC-Subtypen als bei Menschen gibt, die auch anders auf hormonelle Stimulation reagieren. Denkbar wäre also, dass die unterschiedliche TRPC-Subtypen Verteilung, verschiedene biologische Strategien, auch im Bezug auf den Umgang mit Hypoxie widerspiegelt. Denkbar wäre, dass es für den Organismus der Maus ausreichend ist, in Situationen mit vermehrtem EPO-Angebot (Hypoxie) eine Erhöhung der Erythropoese sicherzustellen und eine effektive Retikulozytose in Gang zu setzen. Hierzu wird auch ein vermehrter Abbau reifer bzw. älterer Erythrozyten in Kauf genommen, welche bei erhöhter Eryptose u.a. Eisen für die gesteigerte Erythropoese freigeben. Zusätzlich wäre es denkbar, dass sich durch den vermehrten Abbau älterer Erythrozyten und gesteigerter Erythropoese die Effektivität der Erythrozyten derart steigern lässt, dass es für die Maus ausreichend ist, um beispielsweise eine Hypoxie zu tolerieren. Auch denkbar wäre, dass es für die Maus evolutionsbiologisch einen Überlebensvorteil darstellt, ältere Erythrozyten auch bei erhöhtem EPO-Angebot abzubauen, um thrombembolische Ereignisse zu verhindern bzw. der Verstopfung von Kapillaren durch unflexible Erythrozyten vorzubeugen. Beim Menschen hingegen ist es vermutlich wichtiger, die Hypoxie schnellstmöglich durch ein Überangebot an Erythrozyten sowohl durch Erythropoese, als auch durch verminderte Eryptose aufrecht zu erhalten. Ein erhöhtes Risiko für thrombembolische Ereignisse würde hier zugunsten der Bewältigung der Hypoxie in Kauf genommen.

### **5.3.3 Kalziumsignale bei TRPC 4/5 (-/-) Knock-out Mäusen in Abhängigkeit von PGE<sub>2</sub> und EPO**

Die zuvor getroffene Vermutung über die unterschiedlichen TRPC Sub-Typen bei Mensch und Maus bestätigt sich funktionell, wenn man bei Mäusen die TRP C4/C5 Kanäle ausschaltet. Hier zeigt sich im Gegensatz zum Wildtyp keine Stimulation der intrazellulären Kalziumkonzentration durch EPO. Vielmehr sinkt bei den Respondern die Kalziumionenkonzentration unter die Werte der Kontrollgruppe. Auch der prozentuale Anteil der Responder an der Gesamtheit der Zellen sinkt, was nahelegt, dass TRP C4/C5 für den EPO-induzierten Kalziumioneneinstrom bei Mauserythrozyten verantwortlich ist. Da dieser Einstrom bei humanen Erythrozyten ebenfalls nicht zu beobachten ist, gilt folglich die

Annahme, dass der menschliche Erythrozyt zumindest funktionell keine TRP C4/C5 Kanäle besitzt. Die Reaktion auf PGE<sub>2</sub> Stimulation bzw. EPO und PGE<sub>2</sub> Doppelstimulation verläuft allerdings analog zu den menschlichen Erythrozyten, was vermuten lässt, dass sich auf der Zellmembran von Mauserythrozyten auch TRPC6 Kanäle befinden, die analog, durch PGE<sub>2</sub>-Stimulation, die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration erhöhen.

#### **5.3.4 Kalziumsignale bei TRPC Hepta-Knock-Out Mäusen in Abhängigkeit von PGE<sub>2</sub> und EPO**

Durch zusätzliches Ausschalten aller TRPC-Kanäle verifiziert sich die Annahme, dass TRP C4/C5 für den EPO-stimulierten Kalziumioneneinstrom verantwortlich sein muss. Die Anzahl der Responder liegt erneut deutlich unter der Anzahl an Respondern in der Kontrollgruppe. Auch die Kalziumkonzentration der Responder unterschreitet die der Kontrollgruppe. Hier zeigt sich nun erstmals auch ein prozentual niedrigerer Anteil an Respondern in der PGE<sub>2</sub>+EPO Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, was die Abhängigkeit dieser hormonellen Steuerung von den TRPC-Kanälen verdeutlicht. Einzig die Einzelstimulation mit PGE<sub>2</sub> zeigt erneut die höchsten prozentualen Werte an Respondern und auch unter den Respondern die höchste relative intrazelluläre Kalziumionenkonzentration. Dadurch steht an dieser Stelle noch eine nicht-TRPC-induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumionen im Raum, die durch PGE<sub>2</sub> stimuliert wird. Letztendlich ist die nicht-TRPC-induzierte Erhöhung der Kalziumionenkonzentration keine Fragestellung, die im Rahmen dieser Dissertation geklärt werden kann.

#### **5.3.5 Zusammenfassung und Interpretation der gesammelten Ergebnisse**

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der hormonellen Stimulation von Erythrozyten mit EPO und PGE<sub>2</sub> die Aussage treffen, dass die Wildtyp-Maus kein geeignetes Modell zur Übertragung von Erkenntnissen auf den Menschen ist, wenn es um die Kalziumsignalmessung geht. Bei Wildtyperythrozyten führt eine TRP C4/C5 vermittelte Stimulation durch EPO zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration. Diese Konstellation ist bei gesunden menschlichen Spendererythrozyten nicht gegeben, was darauf zurückzuführen ist, dass menschliche Erythrozyten keine funktionellen TRP C4/C5 Kanäle besitzen. Generell kommt es allerdings bei allen gezeigten Versuchsgruppen, unabhängig der TRPC-Kanäle, zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration durch PGE<sub>2</sub>. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der bekannten Kalziumionenkonzentrationsänderungen durch EPO und PGE<sub>2</sub> bei Erythrozyten und Vorläuferzellen von gesunden humanen Spendern und Mäusen.

**Tabelle 5.1:** Die Tabelle fasst die aktuelle Datenlage des Einflusses von PGE<sub>2</sub> und EPO auf die Kalziumionenänderung von erythroiden Vorläuferzellen und reifen Erythrozyten, unter Beteiligung von TRPC-Kanälen, zusammen. Betrachtet werden hier Erythrozyten und deren Vorläufer von Mäusen (Ergebnisse aus Wildtyp und KO-Maus-Experimenten) und von humanen Spendererythrozyten. Unter Referenzen sind zum einen Ergebnisse anderer Autoren, sowie die Ergebnisse aus dieser Dissertation (Hormonelle Stimulation) zusammengetragen. Eine Steigerung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration wurde durch einen Pfeil nach oben dargestellt. Zwei Pfeile nach oben zeigen eine zusätzliche signifikante Steigerung bei Doppelstimulation an. Die Ergebnisse aus dieser Dissertation wurden besonders durch rote Schrift hervorgehoben.

Spezies	Mensch		Maus	
Zelltyp	Vorläuferzelle	Erythrozyt	Vorläuferzelle	Erythrozyt
Referenz	(Tong et al. 2008, Hirschler-Laszkiewicz et al. 2009)	<b>Ergebnisteil 2.1</b> (Myssina et al. 2003, Kaestner et al. 2004, Föller et al. 2008, Wang et al. 2014)	(Chu et al. 2002)	<b>Ergebnisteil 2.2-2.5</b>
TRPC-Kanal Beteiligung	TRPC3 über TRPC6 reguliert	<b>TRPC6</b>	TRPC2	<b>TRPC4/5</b>
Effekt von EPO auf $\text{Ca}^{2+}$	↑	<b>Kein Effekt</b>	↑	↑
Effekt von $\text{PGE}_2$ auf $\text{Ca}^{2+}$	Keine Daten	↑	Keine Daten	↑
Effekt von EPO + $\text{PGE}_2$ auf $\text{Ca}^{2+}$	Keine Daten	<b>EPO blockt den <math>\text{PGE}_2</math> induzierten <math>\text{Ca}^{2+}</math> Anstieg</b>	Keine Daten	↑↑

# Literaturverzeichnis

Alvarez, J. und Garcia-Sancho, J., An estimate of the number of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in the human red cell. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987, Vol. 903, No. 3, pp. 543-546, ISSN 0006-3002

Andolfo I., Russo R., Manna F., Shmukler BE., Gambale A., Vitiello G., De Rosa G., Brugnara C., Alper SL., Snyder LM. und Iolascon A., Novel Gardos channel mutations linked to dehydrated hereditary stomatocytosis (xerocytosis), *Am J Hematol.* 2015 Oct;90(10):921-6. doi: 10.1002/ajh.24117

Angus M Sinclair, Erythropoiesis stimulating agents: approaches to modulate activity. *Biologics*. 2013; 7: 161-174 doi: 10.2147/BTT.S45971

Bae C., Sachs, F., und Gottlieb, P.A. ; The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4. *Biochemistry*, 2011, 50, 6295-6300.

Baumann, R. Kapitel 7: Blut und Immunsystem, Taschenlehrbuch Physiologie Gekle, M. et al. S.246-248 Auflage 1, Thieme Verlag, 2010, ISBN 978-3-13-144981-8

Berridge, M.J. ; Lipp, P. und Bootman, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000, 1, 11–21

Beutler, E., West, C, und Blume, K.G. ; Removal of leukocytes and platelets from whole-blood. *J. Lab. Med.* 1976, 88, 328-333

Bogdanova, A. , Makhro, A. , Wang, J. , Lipp, P. und Kästner, L. , Review Calcium in Red Blood Cells—A Perilous Balance. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 9848-9872

Bouyer G1, Cueff A, Egée S, Kmiecik J, Maksimova Y, Glogowska E, Gallagher PG, Thomas SL., Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*., *Blood*. 2011 Aug 25;118(8):2305-12. doi: 10.1182/blood-2011-01-329300. Epub 2011 Jul 27.

Bowdler AJ, Williams RH, Dougherty RM. Abrogation of calcium exclusion by erythrocytes under hypotonic stress. *Scand J Haematol.* 1984 Mar;32(3):283-96.

Cahalan SM, Lukacs V, Ranade SS, Chien S, Bandell M, Patapoutian A, Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume, *eLife* 2015;4:e07370. DOI: 10.7554/eLife.07370



Chu X., Tong Q, Cheung JY, Wozney J, Conrad K, Mazack V, Zhang W, Stahl R, Barber DL und Miller BA, Interaction of TRPC2 and TRPC6 in erythropoietin modulation of calcium influx J Biol Chem. 2004 Mar 12;279(11):10514-22. Epub 2003 Dec 29

Dmitry A. Fedosov, Matti Peltomäki und Gerhard Gompper, Deformation and dynamics of red blood cells in flow through cylindrical microchannels, SoftMatter, 2014, 10, 4258 – 4267 DOI:10.1039/c4sm00248b

Drabkin, D.L. und Austin, J.H.; Journal of Biol Chem. ,1935, 112, 51.  
Faucherre A, Kissa K, Nargeot J, Mangoni M, und Jopling C., Piezo1 plays a role in erythrocyte volume homeostasis. Haematologica. 2013; 98:xxx  
doi:10.3324/haematol.2013.086090

Dyrda A., Cytlak U., Ciurazkiewicz A., Lipinska A., Cuffe A., Bouyer G., Egge S., Bennekou P, Lew V. L., Thomas S. L. Y. Local Membrane Deformations Activate Ca<sup>2+</sup>-Dependent K<sup>+</sup> and Anionic Currents in Intact Human Red Blood Cells. PLoS ONE 2010 5(2): e9447. doi:10.1371/journal.pone.0009447

Föller M., Kasinathan RS, Koka S, Lang C, Shumilina E, Birnbaumer L, Lang F, Huber SM., TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes. Cell Physiol Biochem. 2008;21(1-3):183-92. doi: 10.1159/000113760. Epub 2008 Jan 16

Föller M., Ravi S. K., Duranton C., Wieder T., Huber SM und Lang F., PGE2-induced Apoptotic Cell Death in K562 Human Leukaemia Cells, Cell Physiol Biochem 2006;17:201-210

Gardos, G., The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. Biochimica et Biophysica Acta, 1958, Vol. 30, No. 3, (Dec), pp. 653-654, ISSN 0006-3002

Gardos, G., The permeability of human erythrocytes to potassium. Acta Physiologica, 1956, Vol. 4, No. pp. 185-189, ISSN 0231-424X

Gottlieb P.A., Bae C. und Sachs F., Gating the mechanical channel Piezo1 A comparison between whole-cell and patch recording, Landes Bioscience 2012, Channels 6:4, 282-289; July/August 2012

Gressner, A.M. und , Gressner, O.A. Hämoglobinbestimmung; Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik S. 546f Auflage 2, Springer Verlag, 2013, ISBN 978-3-642-12921-6

Grgic I., Kaistha BP, Paschen S, Kaistha A, Busch C, Si H, Köhler K, Elsässer HP, Hoyer J und Köhler R., Disruption of the Gardos channel (KCa3.1) in mice causes subtle erythrocyte macrocytosis and progressive splenomegaly. *Pflügers Arch.* 2009 Jun;458(2):291-302. doi: 10.1007/s00424-008-0619-x. Epub 2008 Nov 27.

Grygorczyk, R., Schwarz, W. und Passow, H., Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human red cells. Comparison of single- channel currents with ion fluxes. *Biophysical Journal*, 1984, Vol. 45, No. 4, pp. 693-698, ISSN 0006-3495

Guillaume Bouyer, Serge Thomas und Stéphane Egée , Patch-Clamp Analysis of Membrane Transport in Erythrocytes, Patch Clamp Technique, Prof. Fatima Shad Kaneez (Ed.), InTech 2012, ISBN: 978-953-51-0406-3

Hänggi P., Makhro A., Gassmann M., Schmugge M, Goede J.S., Speer O., Bogdanova A., Red blood cells of sickle cell disease patients exhibit abnormally high abundance of N-methyl D-aspartate receptors mediating excessive calcium uptake. *Br J Haematol.* 2014 Oct;167(2):252-64. doi: 10.1111/bjh.13028. Epub 2014 Jul 18.

Hänggi P., Telezhkin V., Kemp P.J., Schmugge M., Gassmann M., Goede J.S., Speer O., Bogdanova A., Functional plasticity of the N-methyl-d-aspartate receptor in differentiating human erythroid precursor cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015 Jun 15;308(12):C993-C1007. doi: 10.1152/ajpcell.00395.2014. Epub 2015 Mar 18.

Haugland, R. P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Molecular Probes, 2002

Heinzeller, T. und Büsing, C. Kapitel 2: Histologie, Binde- und Stützgewebe Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg S.88f. Auflage 1 Thieme Verlag, 2001, ISBN 3-13-126831-X

Howard A. Stone, Alison M. Forsyth, und Jiandi Wan, Viewpoint: Slipping through blood flow, Department of Mechanical and Aerospace Engineering, Princeton University, Princeton, NJ 08544, USA October 26, 2009• Physics 2, 89

Immacolata Andolfo, Seth L. Alper, Lucia De Franceschi, Carla Auriemma, Roberta Russo, Luigia De Falco, Fara Vallefucio, Maria Rosaria Esposito, David H. Vandorpe, Boris E. Shmukler, Rupa Narayan, Donatella Montanaro, Maria D'Armiento, Annalisa Vetro, Ivan Limongelli, Orsetta Zuffardi, Bertil E. Glader, Stanley L. Schrier, Carlo Brugnara, Gordon W. Stewart, Jean Delaunay und Achille Iolascon, Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1, *Blood*, 2013, Vol. 121 3925-3935 Prepublished online March 11, 2013; doi:10.1182/blood-2013-02-482489

Kaestner, L., Calcium signalling – Approaches and Findings in the Heart and Blood. Springer Verlag, 2013, ISBN 978-3-642-34617-0

Kaestner L., Cation Channels in Erythrocytes - Historical and Future Perspective, The Open Biology Journal, 2011, 4, 27-34

Kaestner, L., Channelizing the red blood cell: molecular biology competes with patch clamp, Front. Mol. Biosc., 2015, 2:46. Doi: 10.3389/fmolb.2015.00046

Kurzlehrbuch Physiologie Huppelsberg J. und Walter K., Kapitel 4: Kreislauf, Kurzlehrbuch Physiologie S.79f., Auflage 3, Thieme Verlag, 2009, ISBN 978-3-13-136433-3

Lang, F., Gulbins E., Szabo I., Lepple-Wienhues A., Huber SM, Duranton C. Lang KS, Lang PA und Wieder T., Cell volume and the regulation of apoptotic cell death, Journal of molecular recognition, 2004; 17: 473-480

Lang F., Lang KS, Lang PA, Huber SM, Wieder T. Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes. Acta Physiol (Oxf). 2006 May-Jun;187(1-2):191-8.

Li Q., Jungmann V., Kiyatkin A. und Low P.S.. Prostaglandin E<sub>2</sub> Stimulates a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> Channel in Human Erythrocytes un Alters Volume and Filterability, The Journal of Biological Chemistry. 1996; Vol. 271, No. 31, Issue of August 2, pp. 18651-18656

Löffler, G. und Petrides, P. Kap.: 30 Blut, Physiologische Chemie S. 795 Auflage 4 1. Korrigierter Nachdruck Springer-Lehrbuch Verlag, 2014, ISBN 3-540-18163-6

Lux, S.E. Dissecting the red cell membrane skeleton. Nature. 1979 Oct 11;281(5731):426-9)

Maher A.D, und Kuchel P.W. ; The Gárdos channel: a review of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes. Int J Biochem Cell Biol. 2003 Aug;35(8):1182-97

Meyer, J. und ,Remmer, H.W. Die Standardisierung des roten Blutfarbstoffes durch Hämiglobincyanid, Arch. Exper. Path. u. Pharmacol. Bd. 229, S. 450-462 Springer Verlag, 1956, ISSN: 0028-1298

Montell C., The TRP Superfamily of Cation Channels, Science's STKE, 2005: Vol. 2005, Issue 272, pp. re3 DOI: 10.1126/stke.2722005re3

Mitschke R., Interpretation von Veränderungen im Blutausschlag - 2. Erythrozyten und Thrombozyten. In: Fachpraxis. 49, 2006, S. 14–20

R. Schmidt und F. Lang, Kapitel 4: Grundlagen Zellulärer Erregbarkeit, Kapitel 5 Erregungsleitung und synaptische Übertragung, Kapitel VI: Herz und Kreislauf, Physiologie des Menschen S. 70, 76, 103, 566, Auflage 30, Springer Verlag, 2007, ISBN: 978-3-64-201650-9

R. Xiao und X.Z. Shawn Xu, Mechanosensitive Channels: In Touch with Piezo, Curr Biol. 2010 Nov 9; 20(21): R936–R938. doi: 10.1016/j.cub.2010.09.053

Rees DC., Portmann B, Ball C, Mieli-Vergani G, Nicolaou A, Chetty MC und Stewart GW, Dehydrated hereditary stomatocytosis is associated with neonatal hepatitis, Br J Haematol. 2004 Jul;126(2):272-6

Schiebler, T.H. und Korf H.-W.; Allgemeine Entwicklungsgeschichte, Anatomie S.91-124, Auflage 10, Springer Verlag 2007, ISBN 978-3-7985-1770-79

Schlecht, H. , Kapitel A: Die hämologische Methodik, Blutkrankheiten (Medizinische Praxis) S. 5-31 Auflage 2, Springer Verlag, 1952, ISBN 978-3-662-21675-0

Sheenah M. Mische, Mark S. Mooseker und Jon S. Morrow, Erythrocyte Adducin: A Calmodulin-regulated Actin-bundling Protein that Stimulates Spectrin-Actin Binding; The Journal of Cell Biology, 1987, 105: 2837-2845

Silbernagl, S. und Despopoulos, A. Kapitel 4: Blut, Taschenatlas Physiologie S.88-92 Auflage 7 Thieme Verlag, 2006, ISBN 987-3-13-567707-1

Ulfig N., Kapitel 4: Herz-Kreislauf-System und Blut Kap. 4.4: Das Blut, Kurzlehrbuch Histologie S. 75 ff., Auflage 3, Thieme Verlag, 2011, ISBN 978-3-13-193273-0

Wilhelm, S. , Gröbler, B. , Gluch, M. und Heinz, H. , Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Mikroskopie von Carl Zeiss Grundlagen, Carl Zeiss Jena GmbH, 2001

Yingst, D. R. und Hoffman, J. F., Ca-induced K transport in human red blood cell ghosts containing arsenazo III. Transmembrane interactions of Na, K, and Ca and the relationship to the functioning Na-K pump. The Journal of General Physiology, 1984, Vol. 83, No. 1, (Jan), pp. 19-45, ISSN 0022-1295

Wang, J., Van Bentum K., Sester U. und Kaestner L., Calcium homeostasis in red blood cells of dialysis patients in dependence of erythropoietin treatment. Front Physiol. 2014; 5: 16.

# Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt PD Dr. Lars Kaestner für die sehr gute Betreuung, die Erstkorrektur meiner Arbeit, sowie die Motivation und die Stunden der konstruktiven Diskussion und Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter Lipp für die Möglichkeit bedanken meine Doktorarbeit am Institut für molekulare Zellbiologie zu absolvieren.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Institutes für Molekulare Zellbiologie, für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die vielen schönen Stunden auch außerhalb des Arbeitsalltags und die Aufheiterung und die unterstützenden Worte, wenn es mal nicht so rund lief und den Spaß und die gute Laune während der Arbeit.

Besonders danken möchte ich Katja Flügel für die Einweisungen am „Pipetten-Puller“, Laura Hertz für die gute Zusammenarbeit und Einarbeitung in der „Blut-Gruppe“, sowie Benjamin Sauer, Tian Qinghai und Jue Wang für die freundliche Starthilfe am Mikroskop.

Auch möchte ich mich bei Anna Bogdanova, Serge Thomas und Stéphane Egée für die wertvollen Tipps und anregenden Diskussionen im Rahmen des ERCS meetings 2015 in Roscoff bedanken.

Ein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe um Jun.-Prof. Dr. Franziska Lautenschläger, hier besonders Dr. Emmanuel Terraic für die Zusammenarbeit und Herstellung der Microfluidic Chip Devices.

Meinen Eltern danke ich nochmals, dass Sie mir das Studium und die Promotion erst ermöglicht haben und immer für mich da sind und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Last but not least danke ich meiner Frau Marta Anna Lazar-Danielczok, für die starken Nerven beim Korrekturlesen, die Diskussionen während des Korrekturlesens und den kritischen aber konstruktiven Worten nach dem Korrekturlesen. Danke, dass du immer ein offenes Ohr und ein offenes Herz für mich hast.

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jens Gerhard Danielczok geboren am 19.07.1990 in Püttlingen, an Eides Statt, dass diese Arbeit durch mich selbstständig verfasst wurde. Es wurden ausschließlich die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Alle schriftlichen und ggf. elektronisch eingereichten Fassungen stimmen mit dieser überein.

Des weiteren versichere ich, dass ich die beigefügte Dissertation ausschließlich für dieses Promotionsverfahren eingereicht habe. Diesem Promotionsverfahren sind keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift